

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universitätsmedizin Rostock,
Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Georg Lamprecht

Forschungslabor für Gastroenterologie

Leiter: Prof. Dr. med. habil. Robert Jaster

**Antifibrotische Effekte von Regorafenib, Trametinib und Dactolisib
auf kultivierte pankreatische Sternzellen der Ratte**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von:

Laura Witteck, geb. am 29.09.1992 in Rostock

aus Rostock

Rostock, 23. Dezember 2016

Gutachter

- (1) Prof. Dr. med. habil. Robert Jaster,
Zentrum für Innere Medizin der Universitätsmedizin Rostock
Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten
Forschungslabor für Gastroenterologie
- (2) Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz,
Universitätsklinik Rostock
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
- (3) Prof. Dr. rer. nat. Walter Halangk,
Universitätsklinik Magdeburg
Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie

Tag der Verteidigung: 18. Juli 2017

Inhaltsverzeichnis

1	Grundlagen	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.1.1	Erkrankungen des exokrinen Pankreas	1
1.1.1.1	Die chronische Pankreatitis	1
1.1.1.2	Das Pankreaskarzinom	3
1.1.2	Die Rolle pankreatischer Sternzellen bei der Pankreasfibrose	6
1.1.3	Nutzen und Auswahl von Kinaseinhibitoren	11
1.1.4	Charakteristika der verwendeten SMI	12
1.2	Zielstellung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Geräte	16
2.1.2	Allgemeine Labormaterialien	17
2.1.3	Reagenzien und Lösungen für die Zellkultur	17
2.1.4	Lösungen für die Zellproliferationsmessung	18
2.1.5	Lösungen für die Zytotoxizitätsmessung	18
2.1.6	Lösungen und Antikörper für die Proteinanalytik	18
2.1.7	Lösungen für die Nukleinsäureanalytik	20
2.1.8	Lösungen für die IL-6 Bestimmung	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Verwendete Zellen	22
2.2.2	Kultivierung der Zellen	22
2.2.3	Quantifizierung des Zellwachstums	23
2.2.4	Quantifizierung der Zytotoxizität	24
2.2.5	Proteinanalytik	24
2.2.5.1	Probengewinnung	24
2.2.5.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.2.5.3	Proteintransfer auf eine Membran	26
2.2.5.4	Spezifischer Proteinnachweis (Immunoreaktion)	27
2.2.5.5	Detektion mittels Odyssey Infrared Imaging System	27
2.2.6	Nukleinsäureanalytik	28
2.2.6.1	Isolation der RNA	28
2.2.6.2	DNase-Verdau	28

2.2.6.3	Quantitative RNA-Bestimmung	29
2.2.6.4	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.6.5	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription	30
2.2.6.6	Quantitative Echtzeit-PCR (TaqMan)	30
2.2.7	Analyse des IL-6-Gehaltes mittels ELISA	32
2.3	Statistische Auswertung	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Ergebnisse der LTC-7-Zellen	34
3.1.1	Beeinflussung der Zellproliferation durch Kinaseinhibitoren	34
3.1.2	Zytotoxischer Effekt der Inhibitoren	35
3.1.3	Wirkungen der SMI auf Signaltransduktionsebene	36
3.1.4	Konsequenzen der Ergebnisse der LTC-7-Zellen für die Versuche mit primären PSZ	39
3.2	Ergebnisse der primären PSZ	40
3.2.1	SMI-Effekte auf die Zellproliferation	40
3.2.2	Synergistische Effekte von Trametinib und Dactolisib auf das Zellwachstum	41
3.2.3	Zytotoxische Wirkung der Kinaseinhibitoren	42
3.2.4	Auswirkungen der SMI auf die Signaltransduktion	43
3.2.5	Dosisabhängige Wirkung von Dactolisib auf Signaltransduktionsebene	46
3.2.6	Einfluss der Kombination aus Trametinib und Dactolisib auf die Signaltransduktion	49
3.2.7	Analyse der Inhibitoreffekte auf die p70S6-Kinase	51
3.2.8	Einfluss der Kinaseinhibitoren auf den Aktivierungsmarker α -SMA	53
3.2.9	Einfluss der SMI auf die PSZ-Genexpression	53
3.2.10	Veränderung der IL-6-Sekretion durch die Einwirkung der Kinaseinhibitoren	56
4	Diskussion	57
4.1	Auswirkungen der SMI auf LTC-7-Zellen	57
4.1.1	Veränderungen im Zellwachstum durch die Applikation von SMI	57
4.1.2	Beeinflussung der Zytotoxizität durch Kinaseinhibitoren	58
4.1.3	Effekte der SMI auf Signaltransduktionsebene	59
4.1.4	Auswirkungen der LTC-7-Versuche auf die Experimente mit Primärzellen	60
4.2	Effekte der SMI auf Primärzellen	61
4.2.1	Proliferationshemmende Wirkung der Kinaseinhibitoren	61
4.2.2	Vorteile der Kombination aus Trametinib und Dactolisib auf das Zellwachstum	62

4.2.3	Zellschädigende Effekte der SMI	63
4.2.4	Einfluss der Kinaseinhibitoren auf Signaltransduktionsebene	63
4.2.5	Dosisabhängige Inhibition des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges durch Dactolisib	64
4.2.6	Veränderungen auf Signaltransduktionsebene durch die Kombination von Trametinib und Dactolisib	65
4.2.7	Einfluss der SMI auf die Phosphorylierung der p70S6-Kinase	65
4.2.8	Wirkung der Kinaseinhibitoren auf die Expression von α -SMA	66
4.2.9	Beeinflussung der PSZ-Genexpression durch SMI	66
4.2.10	Wirkung der Kinaseinhibitoren auf die Ausschüttung von IL-6	69
4.2.11	Antifibrotische Effekte der SMI bei primären PSZ	69
4.3	Integrative Betrachtung und Ausblick	72
5	Zusammenfassung	73
6	Thesen	I
7	Literaturverzeichnis	III
8	Abkürzungsverzeichnis	XIX
9	Herstellerverzeichnis	XXII
10	Danksagung	XXIV

1 Grundlagen

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Erkrankungen des exokrinen Pankreas

1.1.1.1 Die chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine schubweise und progredient verlaufende Entzündung des Pankreas, bei der infolge von fibrotischen Umbauvorgängen zunächst eine exokrine und später eine endokrine Organinsuffizienz resultieren. Etwa 5 von 100.000 Einwohnern in Westeuropa erkranken jährlich, wobei insbesondere Personen mittleren Lebensalters von 36 bis 55 Lebensjahren von dieser Erkrankung betroffen sind. Bei Männern wird siebenmal häufiger als bei Frauen eine CP diagnostiziert (French und Charnley, 2013). Sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren spielen bei der Entstehung dieser Erkrankung eine entscheidende Rolle. Wesentliche ätiopathogenetische Risikofaktoren sind im TIGAR-O-Schema (toxisch, idiopathisch, genetisch, autoimmun, rezidivierende akute Pankreatitiden, Obstruktion) zusammengefasst (Etemad und Whitcomb, 2001). Übermäßiger Alkoholkonsum ist mit 40 bis 90 % der Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer CP (Yadav und Lowenfels, 2013). Dennoch entwickeln nur 10 – 15 % der Alkoholabhängigen diese Erkrankung (Muniraj *et al.*, 2014). Mit etwa 15 - 25 % ist die idiopathische Genese am zweithäufigsten vertreten, wobei zwischen einer *early-onset* Form mit Erkrankungsbeginn in der zweiten bis dritten Lebensdekade und einer *late-onset* Form unterschieden wird, die nach dem fünften Lebensjahrzehnt auftritt (Keller und Layer, 2008). Der Anteil der idiopathischen CP an allen CP-Formen war in den letzten Jahren rückläufig, da Krankheitsfälle vermehrt auf genetische oder autoimmune Phänomene zurückgeführt werden konnten (Joergensen *et al.*, 2010). Bei jungen Patienten und einer positiven Familienanamnese ist eine genetische Ursache der CP in Betracht zu ziehen. Mittlerweile wurde eine Vielzahl an verantwortlichen Genen detektiert. Dazu gehören u.a. *PRSS1*, *SPINK1*, *CFTR* und *CTRC*. Von zentraler Bedeutung sind Mutationen im *PRSS1*-Gen, welches für ein kationisches Trypsinogen codiert. Folge der autosomal-dominant vererbten Mutation ist eine vermehrte autokatalytische Konversion der enzymatischen Vorstufe Trypsinogen in aktives Trypsin (Rosendahl *et al.*, 2007). 80 % der Familien mit hereditärer Pankreatitis weisen Veränderungen im *PRSS1*-Gen auf (LaRusch und Whitcomb, 2011). Die Pathogenese der alkoholischen CP kann durch die Nekrose-Fibrose-Sequenz beschrieben werden (Klöppel und Maillet, 1992). Rezidivierende Entzündungen des Pankreas führen zur Nekrose oder Apoptose von mesenchymalen, duktalem und/oder

azinären Zellen. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die eine Aktivierung von fibroblastären Zellen hervorrufen. Diese Zellen synthetisieren nun vermehrt Kollagen und Fibronectin, was in einem bindegewebigen Umbau des Organs resultiert (Witt *et al.*, 2007). Werden Gangstrukturen in die Fibrose mit einbezogen, weitet sich ihr Lumen unregelmäßig auf. Dadurch kann das calciumreiche Pankreassekret nicht mehr ungehindert abfließen. Kommt es nun zur Präzipitation, bilden sich Calciumkarbonatsteine (Calculi). Dies hat eine Gangobstruktion mit fortschreitender Atrophie und Fibrose zur Folge (Ammann *et al.*, 1988). Eine detailliertere Darstellung der Mechanismen der Pankreasfibrose folgt in einem späteren Abschnitt (siehe 1.1.2).

Die CP beeinflusst die Lebensqualität der Patienten in erheblichem Maße. Die Einschränkungen im physischen aber auch im mentalen Bereich sind mit anderen chronischen Erkrankungen von Herz, Niere, Lunge und Leber vergleichbar (Amann *et al.*, 2013). Ein Grund dafür ist die Dominanz von Schmerzen, unter denen über 90 % der Patienten leiden (Mullady *et al.*, 2011). Meist handelt es sich um einen Oberbauchschmerz, der sich gürtelförmig bis in den Rücken ausbreiten kann. Mit fortschreitendem Untergang des Pankreasgewebes treten Maldigestionsanzeichen wie Gewichtsverlust, Diarrhoe und Steatorrhoe sowie eine Fettunverträglichkeit auf. Diese Symptome deuten auf eine exokrine Insuffizienz hin, die sich etwa fünf bis zehn Jahre nach Auftreten der CP manifestiert. Bei zusätzlicher endokriner Insuffizienz resultiert ein Diabetes mellitus Typ III (Forsmark, 2013).

Die Therapie der CP dient sowohl der Symptomkontrolle als auch der Vermeidung von Komplikationen. Im Schub wird die CP wie die akute Form behandelt. Dabei steht die ausgiebige Flüssigkeitssubstitution im Vordergrund (Warndorf *et al.*, 2011). Einen hohen Stellenwert nimmt auch die suffiziente Schmerztherapie ein. Sowohl im Schub als auch während schubfreier Phasen stellt die Behandlung von Schmerzen eine große Herausforderung dar (Anderson *et al.*, 2016). Zu den allgemeinen Therapieempfehlungen zählt die Aufnahme häufiger und kleiner Mahlzeiten. Die Zusammensetzung der Nahrung sollte kohlenhydratreich und fettarm sein (Meier *et al.*, 2006). Zum Ausgleich der exokrinen Insuffizienz können pankreatische Enzyme (z. B. Lipase) substituiert werden (Berry *et al.*, 2014). Eventuell ist die parenterale Gabe der fettlöslichen Vitamine A, D, E und K sowie die medikamentöse Einnahme von Calcium und Vitamin D notwendig (Sikkens *et al.*, 2013). Des Weiteren wird, falls notwendig, eine Anpassung des Lebensstils und eine psychosoziale Beratung hinsichtlich Alkoholkarenz empfohlen (Lang *et al.*, 2012).

Eine endoskopische Behandlung oder chirurgische Intervention bei CP ist nur bei unzureichender medikamentöser Schmerzbekämpfung, Komplikationen oder Tumorverdacht indiziert (Braganza *et al.*, 2011). Stenosen oder Strikturen der Pankreas- bzw. Gallengangsstrukturen werden endoskopisch dilatiert oder mit einem Stent versorgt (Treacy und Worthley, 1996). Eine weitere Komplikation stellt die Ausbildung von

Pankreaspseudozysten dar, die CT-gesteuert, endoskopisch oder operativ drainiert werden können. Ebenfalls operativ versorgt werden Patienten mit therapieresistenten Schmerzen. Hierbei ist eine Pankreasteilresektion indiziert (Hoffmeister *et al.*, 2012).

Eine gefürchtete Spätkomplikation der CP ist die Ausbildung eines Pankreaskarzinoms (PK). Das relative Risiko beträgt 13,3 bei allen Arten der CP, bei der hereditären Pankreatitis ist es sogar um den Faktor 69,0 gegenüber der Normalbevölkerung erhöht. Dennoch entwickeln maximal 5 % der Patienten mit CP einen Tumor der Bauchspeicheldrüse innerhalb von 20 Jahren (Raimondi *et al.*, 2010).

Auch die Mortalität ist bei Patienten mit CP mit einer Hazard Ratio von 5 gegenüber der Normalbevölkerung erhöht (Bang *et al.*, 2014).

1.1.1.2 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom (PK) ist die neunthäufigste Tumorerkrankung in Europa. Schätzungsweise 83.250 Menschen werden im Jahr 2015 in der Europäischen Union neu erkranken. Daraus ergibt sich eine Inzidenz von 8,2/100.000 (ASR) für Männer und 5,9/100.000 (ASR) für Frauen (Ferlay *et al.*, 2015). Das Lebenszeitrisko für die Entwicklung dieses Karzinoms liegt bei 1,3 % (Public Health Agency of Canada, 2015).

Das PK ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Bei Diagnosestellung sind die Patienten durchschnittlich $70,3 \pm 12,5$ Jahre alt. Bei den unter 60-Jährigen sind vermehrt Männer betroffen, wohingegen bei einem Alter von über 80 Jahren die Diagnose bei Frauen häufiger gestellt wird (Raju *et al.*, 2015).

Sowohl genetische als auch umweltbedingte Risikofaktoren tragen zur Entwicklung eines PK bei. Es wird davon ausgegangen, dass bei bis zu 10 % der Patienten eine hereditäre Komponente ursächlich ist (Del Chiaro *et al.*, 2007). Es gibt mehrere vererbte Tumorsyndrome, die mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Bauchspeicheldrüsentumors einhergehen. Hervorzuheben ist dabei das Peutz-Jeghers-Syndrom, bei dem eine autosomal-dominante Mutation im *STK11*-Tumorsuppressorgen vorliegt. Fast 40 % der Betroffenen erkranken bis zum 70. Lebensjahr an einem PK (Fendrich *et al.*, 2014). Bei einem anderen Teil der Patienten liegt ein familiäres PK vor. Die Betroffenen gehören Familien an, in denen zwei oder mehr erstgradig Verwandte am PK erkranken, ohne dass ein vererbbares Tumorsyndrom nachgewiesen werden kann (Brand *et al.*, 2007). Eine weitere genetische Ursache für die Ausbildung eines Bauchspeicheldrüsentumors besteht im Vorhandensein einer hereditären Pankreatitis (siehe oben).

Dem gegenüber stehen die modifizierbaren umweltbedingten Risikofaktoren als Ursache für die Entstehung eines PK. Dabei ist insbesondere der Nikotinabusus zu nennen. Er ist der

größte identifizierte Risikofaktor und verantwortlich für 20 – 35 % der PK-Fälle (Iodice *et al.*, 2008). Durch das Rauchen gelangen Nitrosamine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sowie deren Metabolite ins Blut und verursachen im Folgenden Mutationen im *K-ras*- und *p53*-Gen (Duell, 2012). Auch verstärkter Alkoholkonsum (> 44 g Alkohol/d) steigert das PK-Risiko (Gupta *et al.*, 2010). Mit zunehmender Dosis ist ein Anstieg des relativen Risikos auf 1,3 festzustellen (Tramacere *et al.*, 2010).

Liegt ein Body-Mass-Index von über 35 kg/m² vor, erhöht sich das relative Risiko für die Entwicklung eines Bauchspeicheldrüsentumors um den Faktor 1,4 bis 2,7 (Anderson *et al.*, 2009). Eine langjährige Diabetes mellitus Erkrankung steigert die Wahrscheinlichkeit ein PK zu entwickeln ebenfalls. Dabei zeigte sich, dass das relative Risiko mit 2,0 beim Diabetes mellitus Typ I gegenüber einem Wert von 1,8 beim Diabetes Typ II leicht angehoben ist (Huxley *et al.*, 2005; Stevens *et al.*, 2007).

Die Entstehung von Neoplasien der Bauchspeicheldrüse ist ein fortschreitender Prozess, bei dem Veränderungen der molekularen Regulation der Zellen hervorgerufen werden. Dabei kommt es zunächst zur Ausbildung von Vorläuferläsionen, die bei weiterer Akkumulation von genetischen Veränderungen in einem PK münden können.

Die meisten Tumore der Bauchspeicheldrüse resultieren aus pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN). Bei dieser Vorläuferläsion handelt es sich um mikroskopisch sichtbare, unter 5 mm kleine Areale von flachem oder papillärem neoplastischen Epithel (Hruban *et al.*, 2000). Es werden drei Schweregrade unterschieden, wobei Grad 1 eine *low-grade* Dysplasie beschreibt, währenddessen Grad 3 bereits eine *high-grade* Läsion und demnach ein *carcinoma in situ* darstellt. Am Anfang der PanIN-Entwicklung stehen meist die Verkürzung der Telomere sowie die Mutation von K-ras. Punktmutationen von K-ras werden bei 90 % der PK beschrieben (Remmers *et al.*, 2010). Sie führen zum Aktivitätsverlust der assoziierten GTP-ase, wodurch K-ras nicht mehr inaktiviert werden kann. K-ras steuert nun vermehrt wachstumsfördernde Signalwege wie den Ras/Raf/MEK/ERK- und PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg an (Logsdon und Lu, 2016). Die Verkürzung von Telomeren führt zur Fusion von Chromosomen mit daraus resultierender Chromosomeninstabilität (Maitra *et al.*, 2006). Mit weiterem Fortschreiten der Neoplasie tritt der Verlust von p53, SMAD 4 und p16^{ink4A} auf (Kanda *et al.*, 2012; Löhner *et al.*, 2005; van Heek *et al.*, 2002). Bis aus einer Vorläuferläsion ein Karzinom entstanden ist, haben sich durchschnittlich 63 genetische Alterationen akkumuliert, die sich auf zwölf Signalwege verteilen (Jones *et al.*, 2008).

Histologisch handelt es sich bei 80 – 85 % der Bauchspeicheldrüsentumoren um ein duktales Adenokarzinom. Dieses ist gekennzeichnet durch eine Veränderung der Gangstrukturen mit der Ausbildung von unregelmäßigem und mehrschichtigem Epithel. Deutlich seltener finden sich azinäre Adenokarzinome und neuroendokrine Tumoren des Pankreas (Klöppel *et al.*, 1996). Etwa zwei Drittel der PK sind im Caput lokalisiert, 15 %

betreffen den Corpus und bei jeweils 10 % ist eine Infiltration der Cauda bzw. ein multifokaler Befall zu diagnostizieren (Ghaneh *et al.*, 2008). Frühsymptome sind bei Patienten mit einem Bauchspeicheldrüsentumor nicht zu erwarten. Aufgrund dessen und durch das Fehlen einer geeigneten Screeningmethode wird ein PK meist erst in fortgeschrittenen Stadien entdeckt, was sich nachteilig auf die Prognose der Patienten auswirkt (DaCosta *et al.*, 2013). Oft führen nur unspezifische Spätsymptome wie Oberbauchschmerzen, Gewichtsverlust, Übelkeit und z. T. auch Rückenschmerzen zur Diagnose.

Das einzig potenziell kurative Therapieverfahren des PK ist die chirurgische Therapie. So beträgt die relative Ein-Jahres-Überlebensrate annähernd 50 %, wenn operiert wird. Ohne chirurgische Therapie liegt sie hingegen nur bei etwa 11 % (Sharp *et al.*, 2009). Problematisch ist jedoch, dass sich 80 – 90 % der Patienten bei Diagnosestellung als inoperabel erweisen. Bei der Hälfte der Patienten sind bereits Fernmetastasen – insbesondere in der Leber – nachweisbar (Weinberg *et al.*, 2015).

Das Standardverfahren bei Pankreaskopftumoren ist die partielle Duodenopankreatektomie mit oder ohne Pyloruserhalt. Bezüglich der Rate an Komplikationen und Letalität sowie der Langzeitergebnisse zeigt sich kein Unterschied zwischen pyloruserhaltender und magenresezierender partieller Duodenopankreatektomie – auch als klassische Kausch-Whipple-Operation bezeichnet (Diener *et al.*, 2007). Liegt das Karzinom im Pankreasschwanz erfolgt die Pankreaslinksresektion, bei Tumoren im Pankreascorpus die subtotale Pankreaslinksresektion oder die totale Duodenopankreatektomie (Christein *et al.*, 2005). Bei 75 % der Operationen ist die prognostisch wichtige mikroskopische Tumorfreiheit der Resektionsränder nicht zu erzielen (Esposito *et al.*, 2008; Fatima *et al.*, 2010).

Nach erfolgter Operation erhalten die Patienten eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5-Fluoruracil/Folinsäure (Neoptolemos *et al.*, 2010). Diese Therapie verlängert das krankheitsfreie Überleben und steigert die Fünf-Jahres-Überlebensrate auf 20 % gegenüber einer Rate von 10 % bei alleiniger Operation (Oettle *et al.*, 2007; Ueno *et al.*, 2009). Generell muss aber festgestellt werden, dass Neoplasien der Bauchspeicheldrüse ein schlechtes Ansprechen auf Zytostatika zeigen (Binenbaum *et al.*, 2015).

Ist das Pankreaskarzinom lokal fortgeschritten bzw. sind Fernmetastasen vorhanden, wird eine palliative Chemotherapie mit Gemcitabin durchgeführt. Ergänzt werden kann die Therapie mit dem EGF-Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib (Moore *et al.*, 2007). Bei Patienten mit günstigem Risikoprofil und sehr gutem Allgemeinzustand ist die Verwendung des FOLFIRINOX-Schemas, bestehend aus 5-Fluoruracil, Folinsäure (Leucovorin), Irinotecan und Oxaliplatin, denkbar. Hierunter wurde eine Verlängerung sowohl des medianen Überlebens wie auch des progressionsfreien Intervalls festgestellt. Ebenfalls erhöhte sich die Ansprechrate des Tumors von etwa 9 % unter alleiniger Gemcitabintherapie auf ca. 31 %.

Auf der anderen Seite kam es aber zu einem deutlichen Anstieg der Toxizität (Conroy *et al.*, 2011). Eine weitere Möglichkeit der palliativen Therapie besteht in der Kombination aus Gemcitabin mit nab-Paclitaxel. Auch hier kommt es zu einer Verbesserung des progressionsfreien und medianen Überlebens sowie einer besseren Zytostatikaansprechrate des Tumors. Negativ ist aber die erhöhte Rate an Neuropathien sowie Myelosuppression (Hoff *et al.*, 2013). Derzeit befinden sich weitere Kombinationstherapien sowie molekulare Therapiestrategien (*targeted therapy*) in klinischer Testung. Es wird empfohlen, Patienten in diese Studien einzuschließen, um ihre Prognose zu verbessern (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

Trotz hoher Anstrengungen neue und bessere Therapieoptionen zu entwickeln, ist die Überlebenszeit von Menschen mit einem PK weiterhin sehr gering. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt relativ konstant bei unter 10 % (Hurton *et al.*, 2014).

Laut Prognose für das Jahr 2030 wird das PK die zweithäufigste Krebstodesursache in den USA sein, obwohl es bei der Inzidenz nur den zehnten Platz belegen wird (Rahib *et al.*, 2014).

1.1.2 Die Rolle pankreatischer Sternzellen bei der Pankreasfibrose

Sowohl bei der CP als auch beim PK findet eine vermehrte Bildung von Bindegewebe statt, was als Fibrose bezeichnet wird. Bei der CP resultiert diese aus Wundheilungsprozessen, beim PK ist sie das Ergebnis aus Interaktionen zwischen Tumor- und Umgebungszellen. In beide Prozesse sind pankreatische Sternzellen (PSZ) involviert.

PSZ wurden erstmals 1982 von Watari beschrieben (Watari *et al.*, 1982). Es dauerte allerdings bis 1998, ehe sie isoliert und kultiviert werden konnten (Apte *et al.*, 1998). Meist sind PSZ perivaskulär, interazinär oder interlobulär in der Bauchspeicheldrüse vorzufinden (Ikejiri, 1990). Durch ihre Fähigkeit, Vitamin A sowie Lipide speichern zu können und aufgrund ihrer Morphologie besteht eine Ähnlichkeit zu hepatischen Sternzellen. Im gesunden Pankreas machen PSZ 4 – 7 % der Parenchymzellen aus und befinden sich im ruhenden Zustand (Apte *et al.*, 1998; Bachem *et al.*, 1998). In diesem weisen sie die Zytoskelettproteine Nestin, Desmin, Vimentin und GFAP (*glial fibrillary acid protein*), aber auch neuroektodermale Marker wie NGF (*nerve growth factor*) und NCAM (*neural cell adhesion molecule*) auf (Apte *et al.*, 2012).

PSZ haben die Fähigkeit zur Proliferation, Migration und Produktion von extrazellulärer Matrix (EZM), welche sich aus Kollagen, Fibronectin und Laminin zusammensetzt. Auf der anderen Seite stellen sie matrixabbauende Enzyme (Matrixmetalloproteinasen, MMP) sowie deren Inhibitoren (*tissue inhibitor of metalloproteinases*, TIMPs) her. Damit sorgen ruhende PSZ für ein Gleichgewicht aus Auf- und Abbau der EZM (Phillips *et al.*, 2003).

Eine Studie aus dem Jahr 2009 ging der Frage nach, ob PSZ Progenitorfunktionen aufweisen. Dazu wurden die Zellen mittels Mitoxantron selektiert und auf Stammzellmarker untersucht. PSZ waren positiv für den ABCG 2 Transporter (*ATP binding cassette G2 transporter*) und konnten nach Zelldifferenzierung Insulin sezernieren. Ob diese Ergebnisse auch auf unselektionierte und demnach alle PSZ zutreffen, konnte aber nicht gezeigt werden (Mato *et al.*, 2009).

Ebenfalls untersucht wurden immunologische Funktionen von ruhenden PSZ. Sie sind in der Lage, nekrotische Azinuszellen zu internalisieren, wobei daraus auch ihr eigener Zelltod resultiert. Es wird davon ausgegangen, dass PSZ eine lokal protektive angeborene Immunfunktion im Sinne einer Progressionsverzögerung bei Schäden des Pankreas ausüben (Shimizu *et al.*, 2005). Unterstützt wird diese Aussage durch die Erkenntnis, dass PSZ Toll-like Rezeptoren (TLR 2-5,9) aufweisen, die der Erkennung von PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) dienen (Masamune *et al.*, 2008). Überprüft wurde daraufhin die Frage, ob PSZ auch Funktionen im erworbenen Immunsystem ausüben. Dies wurde zuvor schon für hepatische Sternzellen belegt, die Proteinantigene präsentieren können (Unanue, 2007; Winau *et al.*, 2007). Es zeigte sich aber, dass PSZ keine antigenpräsentierende Zellmarker wie MHC II (*major histocompatibility complex II*) oder HLA-DR (*human leukocyte antigen – DR*) exprimieren (Shimizu *et al.*, 2012).

Die Bedeutung von PSZ auf die exokrine Funktion des Pankreas ist schon länger bekannt. Doch erst kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, die den Einfluss auf endokrine Zellen *in vitro* und im Tiermodell untersuchte. PSZ in der Umgebung von β -Zellen reduzierten die Insulinsekretion und führten zum Zelltod der β -Zellen (Zha *et al.*, 2014).

Die bisher geschilderten Funktionen finden sich bei ruhenden PSZ. Im Rahmen von chronischen Pankreasschädigungen sind die Zellen aber auch in der Lage, in einen aktivierten Zustand überzugehen. Dieser ist gekennzeichnet durch einen Verlust der Vitamin-A-Speicherung und die vermehrte Expression von α -SMA (*alpha-smooth muscle actin*) (Apte *et al.*, 1998; Bachem *et al.*, 1998). Dabei handelt es sich um ein Zytoskelettprotein, welches an der Zellmotilität, -struktur und -integrität beteiligt ist und wodurch die Zellen ihr sternförmiges Aussehen annehmen. Mit ihrer Aktivierung gehen PSZ in einen myofibroblastischen Phänotyp über und produzieren große Mengen an EZM. Die Aktivierung von PSZ kann durch diverse Faktoren erfolgen. Zu den wichtigsten zählen Zytokine, Wachstumsfaktoren, oxidativer Stress sowie Ethanol und seine Metabolite. TNF- α sowie die Interleukine 1, 6 und 13 aktivieren die Proliferation von PSZ und/oder deren α -SMA-Expression (Mews *et al.*, 2002). Als Hauptstimulator für die Synthese und Sekretion von EZM (insbesondere Kollagen) gilt TGF- β (Apte *et al.*, 1999). Ein weiterer mitogener und chemotaktischer Faktor ist das PDGF (*platelet-derived growth factor*) (Schneider *et al.*, 2001).

Auch Ethanol und sein Metabolit Acetaldehyd wirken aktivierend auf PSZ. Dieser Effekt wird über die Adressierung von ERK 1/2, JNK und p38 vermittelt (McCarroll *et al.*, 2003). Des Weiteren verhindert Ethanol die Apoptose von PSZ (Vonlaufen *et al.*, 2011).

Abgesehen von diesen parakrinen Aktivierungsfaktoren produzieren PSZ selbst inflammatorische Zytokine wie TGF- β , CTGF sowie IL-1 und -8. Dadurch werden auch autokrine Signalwege zur Aktivitätserhaltung genutzt (Kruse *et al.*, 2000; Shek *et al.*, 2002). Die Aktivierung von PSZ stellt an sich keinen pathologischen Vorgang dar, sondern ist notwendig, um Wundheilungsprozesse einleiten zu können. Zur Pankreasfibrose kommt es nur, wenn keine Seneszenz, Apoptose oder Hemmung der Aktivierung von PSZ stattfindet. Der Begriff Seneszenz beschreibt den Prozess der Zellalterung. Im Rahmen der CP korreliert die Anzahl seneszenten Zellen mit der Schwere der Entzündung. Seneszente PSZ zeigen sich anfälliger für Zytolyse (Fitzner *et al.*, 2012).

Ins Blickfeld neuer Therapiemöglichkeiten rückten auch endogene Antagonisten der PSZ-Aktivierung. Dabei zeigte sich, dass Vitamin A hemmende Wirkung auf die Aktivierung von PSZ und deren Kollagensynthese besitzt (Jaster *et al.*, 2003). Vitamin A adressiert dabei den Wnt- β -Catenin-Signalweg. Ein Mausmodell der CP bestätigte die Wirkung von Vitamin A auch auf die Apoptose von PSZ über die Hemmung dieses Signalweges (Xiao *et al.*, 2015). Bei Untersuchungen am PK führte eine verminderte Ansteuerung des Wnt- β -Catenin-Signalweges infolge der Vitamin-A-Gabe zu einer Reduktion der Tumorprogression (Froeling *et al.*, 2011).

Ein anderer, in den letzten Jahren aufkommender, Therapiefokus zielt auf die Blockierung von intrazellulären Signalwegen in PSZ ab. Für die Aktivierung von PSZ sind drei Signalwege von Bedeutung. Ethanol und seine Metabolite sowie oxidativer Stress vermitteln ihre Effekte über mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK). Dazu gehören extrazellulär regulierte Kinasen (ERK 1/2), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und p38 (Jaster *et al.*, 2002; Masamune *et al.*, 2003c; Masamune *et al.*, 2004; McCarroll *et al.*, 2003). Ebenfalls findet eine Aktivierung *upstream* der MAPK statt, indem es zur Adressierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-K) kommt (McCarroll *et al.*, 2004). Die Expression des Zytoskelettproteins α -SMA und seine Organisation in Stressfasern wird über den Rho/Rho-Kinase-Signalweg reguliert (Masamune *et al.*, 2003b).

Im Rahmen der CP werden PSZ durch Mediatoren von geschädigten Azinuszellen, Entzündungszellen sowie Blutplättchen aktiviert (Gukovskaya *et al.*, 1997; Luttenberger *et al.*, 2000). PSZ sind bereits in frühen Phasen der Erkrankung präsent. Sie befinden sich in räumlicher Nähe zu Makrophagen um Nekroseareale herum und verursachen dort einen fibrotischen Umbau des Gewebes. Liegt eine alkoholtoxische Genese der CP vor, ist davon

auszugehen, dass in frühen Stadien der Erkrankung durch Alkoholkarenz eine Regression mit Rückgang der Fibrose möglich ist (Vonlaufen *et al.*, 2011).

Fibrose ist ein aktiver und dynamischer Prozess. Dies wird insbesondere im Hinblick auf die Interaktion zwischen Tumor und Stroma beim PK deutlich. Die Mikroumwelt des Tumors ist geprägt von EZM, Fibroblasten, Blutgefäßen und Immunzellen. Die Umgebung des Tumors wird bindegewebig umgebaut, was als desmoplastische Reaktion bezeichnet wird. Das Stroma macht 50 – 80 % der Tumorzellmasse aus und bildet eine Barriere um die Karzinomzellen (Apte *et al.*, 2015). Wichtiger Bestandteil des Stromas sind PSZ. PSZ und Tumorzellen beeinflussen sich gegenseitig (siehe Abb. 1.1). Karzinomzellen sezernieren bFGF, PDGF sowie TGF- β und können damit zur Aktivierung von PSZ beitragen (Bachem *et al.*, 2005; Kuniyasu *et al.*, 2001; Löhr *et al.*, 2001). Dem gegenüber schütten PSZ mitogene, anti-apoptotische und invasionsfördernde Mediatoren aus, die die Tumorzellen beeinflussen. Die Sekretion von Kollagen I induziert eine Chemoresistenz der Karzinomzellen und MMP-2 bewirkt eine Erleichterung der Zellinvasion und damit Tumorprogression (Armstrong *et al.*, 2004; Miyamoto *et al.*, 2004; Schneiderhan *et al.*, 2007). Zusätzlich erhöht TGF- β die Zellmotilität und vermittelt den Verlust der Adhäsion, wodurch die Invasivität des Tumors zunimmt und das Metastasierungsrisiko steigt (Bhowmick *et al.*, 2004). Diese *in vitro* Daten werden durch Ergebnisse eines Mausmodells unterstützt, indem gezeigt werden konnte, dass Tumorzellen, die zusammen mit PSZ in eine Maus injiziert wurden, ein stärkeres Wachstum aufwiesen als dies bei der alleinigen Injektion von Tumorzellen der Fall war (Bachem *et al.*, 2005).

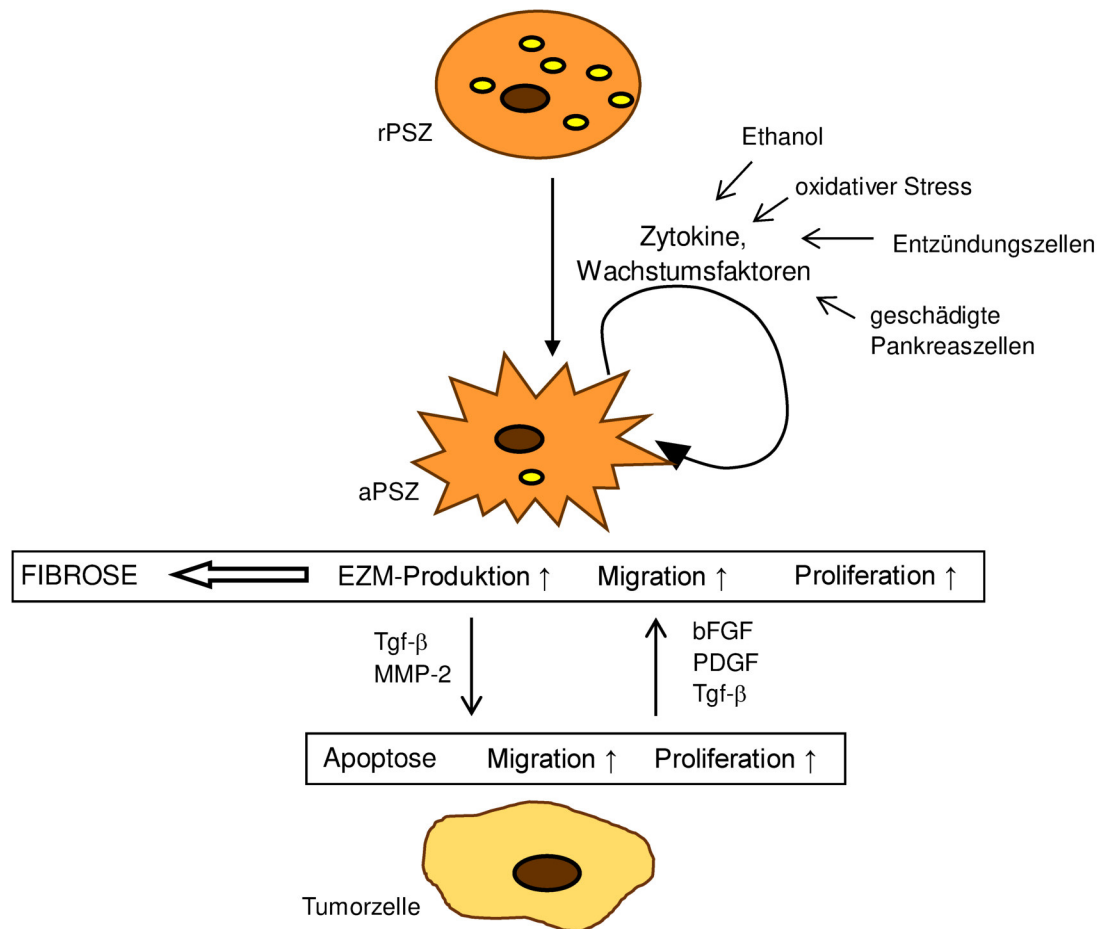


Abb. 1.1 Aktivierung von PSZ und die gegenseitigen Wechselwirkungen mit Tumorzellen (modifiziert nach Jaster, 2004; Wilson *et al.*, 2014)

Ruhende PSZ (rPSZ) werden durch Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert (aPSZ). Auch autokrine Signalwege können zur Aktivitätserhaltung genutzt werden. aPSZ produzieren vermehrt EZM und bedingen dadurch die Pankreasfibrose. Durch Ausschüttung von Mediatoren beeinflussen sich aPSZ und Tumorzellen wechselseitig.

Das durch die desmoplastische Reaktion gebildete Stroma bildet eine physikalische Barriere um das PK. Dies könnte erklären, warum Zytostatika nicht zum Tumor vordringen können und Neoplasien der Bauchspeicheldrüse weitgehend chemoresistent sind (Provenzano *et al.*, 2012; Whatcott *et al.*, 2012). Mit tierexperimentellen Studien und Untersuchungen an Patienten mit einem PK konnte Sherman 2014 diese These untermauern. Wurden Vitamin D-Rezeptoren im Stromagewebe des Tumors aktiviert, so konnte der ruhende Phänotyp von PSZ induziert werden. Dadurch war die antitumorale Chemotherapie besser wirksam (Sherman *et al.*, 2014). Andererseits konnte in den letzten Jahren aber auch gezeigt werden, dass die alleinige Beseitigung des Stromas nicht ausreichend ist, um das Therapieansprechen und damit die Prognose zu verbessern. Özdemir *et al.* entwickelten ein Mausmodell mit depletierten α -SMA-Myofibroblasten bei vorhandenem PanIN oder Adenokarzinom des Pankreas. Bei Tieren mit Stromadepletion stieg die Invasivität des

Tumors und die Überlebenszeit war geringer als bei den Kontrolltieren. Auffällig war auch die Suppression der Immunfunktion mit erhöhten Spiegeln an CD4⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen (Özdemir *et al.*, 2014). Eine weitere Untersuchung zur Stromadepletion bediente sich eines *Sonic hedgehog* Knock-out Mausmodells mit PK. *Sonic hedgehog* ist ein lösliches Protein des Hedgehog-Signalweges. Dieser ist üblicherweise im adulten Pankreas ausgeschaltet. Eine Reaktivierung im Rahmen des PK führt zu vermehrter Stromabildung. Findet nun eine Deletion von *Sonic hedgehog* statt, kommt es zur Reduktion des Stromas. Damit verbunden sind aber auch eine undifferenziertere Tumorphistologie, eine vermehrte Aggressivität des Tumors mit Metastasenbildung und eine Erhöhung der Zellproliferation. Letztendlich war das Überleben der Knock-out-Tiere gegenüber den Kontrollmäusen reduziert (Rhim *et al.*, 2014).

Vergleicht man die *in vitro* und *in vivo* Daten miteinander, so stellt sich die Frage, ob PSZ die Tumorprogression unterstützen oder verhindern. Wang ist zu der Erkenntnis gelangt, dass beide Theorien koexistieren können. Im Frühstadium des PK besitzt der kleine Tumor nur einen schmalen PSZ-Saum. In dieser Situation sind PSZ in der Lage den Tumorprogress aufzuhalten. Wächst der Tumor und verbreitert sich demnach auch die Stromabarriere, produzieren PSZ vermehrt wachstumsfördernde und mitogene Faktoren. Entfernt man im Spätstadium nun das Stroma, kann sich der aggressive Tumor ungehindert ausbreiten. Entscheidend ist demnach das Gleichgewicht aus Tumorzellen und Stroma (Wang *et al.*, 2016). Denkbar ist auch, dass unterschiedliche Subpopulationen von fibroblastären Zellen aus der Mikroumgebung des Tumors unterschiedliche Funktionen ausüben, deren Gewichtung sich im Rahmen der Tumorprogression ändert (Mathew *et al.*, 2016). Eine Modulation von PSZ sollte demnach der Depletion vorgezogen werden.

1.1.3 Nutzen und Auswahl von Kinaseinhibitoren

Proteinkinasen sind Enzyme, die die Übertragung einer Phosphatgruppe von einem Donor auf die Hydroxygruppe einer Aminosäure katalysieren. Diese posttranslationale Modifizierung greift in die Signaltransduktion der Zellen ein. Dabei kann sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibition resultieren, je nachdem, welche Ladungs- oder Konformationsänderung im Zielprotein hervorgerufen wird. Blockiert man nun mittels Inhibitoren spezifische Proteinkinasen, so ist der abhängige Signalweg gehemmt. Kinaseinhibitoren, auch als *small molecule inhibitors* (SMI) bezeichnet, können in der Behandlung von Karzinomen und Entzündungen eingesetzt werden. Auch Nicht-Tumorzellen, wie PSZ, können durch Kinaseinhibitoren adressiert werden. Dabei ist es notwendig, in den Zielzellen die Proteine der entscheidenden Signalwege zu identifizieren. In PSZ sind sowohl der Ras/Raf/MEK/ERK- als auch der PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg von

besonderer Bedeutung. Die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade leitet Signale von Zelloberflächenrezeptoren über drei hintereinander geschaltete MAPK bis hin zu Transkriptionsfaktoren. Letztlich resultiert daraus über die Phosphorylierung regulatorischer Proteine wie Bcl-2, Bad und Caspase 9 eine Beeinflussung der Zellzyklusprogression, Differenzierung und Apoptose der Zellen (McCubrey *et al.*, 2007; Pearson *et al.*, 2001). Dem Signalweg vorangeschaltet ist Ras, ein GTP-bindendes Protein, welches sowohl die Ras/Raf/MEK/ERK- als auch die PI3-K/AKT/mTOR-Kaskade aktivieren kann (Chuang *et al.*, 1994; Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994). Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung des PI3-K/AKT/mTOR-Signalwegs besteht in der Stimulierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Auch diese Signalkaskade ist an der Förderung von Proliferation und Hemmung von apoptotischen Prozessen über die Regulation diverser Proteine beteiligt (Cantley, 2002; Downward, 1998).

Das erste Auswahlkriterium, der in der Arbeit verwendeten Kinaseinhibitoren bestand in der Fähigkeit des SMIs, Proteine aus einem der beiden geschilderten Signalwege zu hemmen oder Multikinaseinhibitor-Eigenschaften aufweisen zu können. Ebenfalls wurden nur Kinaseinhibitoren mit einbezogen, die entweder bereits für die Anwendung am Menschen zugelassen sind oder sich zum Zeitpunkt der Arbeit in klinischer Testung befanden.

1.1.4 Charakteristika der verwendeten SMI

Für die *in vitro* Studien an PSZ wurden insgesamt fünf Kinaseinhibitoren ausgewählt. Dabei handelte es sich um Dactolisib, Perifosin, Trametinib, Vemurafenib und Regorafenib. Jeweils zwei der Inhibitoren hemmen Proteine des PI3-K/AKT/mTOR- oder des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs und ein SMI ist ein Multikinaseinhibitor.

Dactolisib (NVP-BEZ235) ist ein dualer ATP-kompetitiver PI3-K- und mTOR-Inhibitor mit IC₅₀-Werten im niedrigen nanomolaren Bereich. Biochemisch wurde der SMI aus einem Imidazol[4,5-c]Quinolin-Grundgerüst entwickelt. Dactolisib kann oral eingenommen werden. Das Medikament wird in der Leber eliminiert (Maira *et al.*, 2008). Der Kinaseinhibitor wird bzw. wurde u. a. in klinischen Phase I oder II Studien beim pankreatischen neuroendokrinen Tumor, Mammakarzinom sowie bei akuter Leukämie getestet (U.S. National Institutes of Health 2008; U.S. National Institutes of Health 2012a; U.S. National Institutes of Health 2012b).

Der zweite SMI ist das Alkylphospholipid Perifosin (KRX-0401). Auch dieser Inhibitor ist oral anwendbar und führt zu einer Hemmung der AKT-Phosphorylierung im einstelligen mikromolaren Wirkungsbereich (Richardson *et al.*, 2012). Unter SMI-Einfluss nahm der Anteil von plasmamembrannahmem AKT ab. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Perifosin einen Zellzyklusarrest über eine Induktion von p21^{WAF1/CIP1} bewirkt, die unabhängig von p53

verläuft. Die *upstream* von AKT im Signalweg gelegene PI3-K wird aber durch den Inhibitor nicht affektiert (Kondapaka *et al.*, 2003). Die Wirkung von Perifosin wird bzw. wurde in klinischen Phase I bis III Studien bei mehreren Tumorentitäten getestet. Dazu gehören insbesondere das kolorektale Karzinom wie auch verschiedene Gehirntumorarten (Astrozytom, Oligodendrogliom, Glioblastom) und das multiple Myelom (Bendell *et al.*, 2011; Jakubowiak *et al.*, 2012; U.S. National Institutes of Health, 2007).

Ein weiterer Kinaseinhibitor, das Trametinib, greift in die Signaltransduktion des Ras/Raf/MEK/ERK-Weges ein. Es handelt sich um ein Pyridin- und Pyrimidinderivat mit hochpotenter MEK 1- und 2-Inhibitor, dessen Wirkung sich auch bei niedrigenmolaren Konzentrationen entfaltet. In *in vitro* Zellkulturstudien an Tumorzelllinien (SK-MEL-28, A-375P(F11), A549 und HCT-116) konnte eine Wachstumshemmung durch die Trametinibgabe insbesondere bei B-Raf^{V600E}- oder Ras-Mutationen nachvollzogen werden. Im Xenograftmodell A-375P(F11) eines B-Raf^{V600E} mutierten Melanoms wurde der SMI einmal täglich oral verabreicht und führte zu einer Suppression des P-ERK1/2 Niveaus für mehr als 24 h. Außerdem kam es zu einer Reduktion des Zellproliferationsmarkers Ki67 (Gilmartin *et al.*, 2001). Seit 2013 ist Trametinib für die Behandlung von Patienten mit B-Raf^{V600E}-mutiertem metastasiertem Melanom zugelassen (U.S. Food and Drug Administration, 2013). Außerdem befindet sich der Inhibitor u. a. in klinischen Phase II Studien zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchial- und Prostatakarzinoms (Blumenschein *et al.*, 2015; U.S. National Institutes of Health, 2013).

Vemurafenib (PLX4032) ist ein SMI, der zu einer Hemmung von B-Raf^{V600E} und erst in höheren Konzentrationen auch von C-Raf und Wildtyp-B-Raf führt. Dadurch wird auch das *downstream* liegende ERK-Signal gehemmt. Der Kinaseinhibitor hat eine dreifach erhöhte Selektivität für mutiertes B-Raf^{V600E} gegenüber dem Wildtyp (Smalley, 2010). Dadurch sind auch die IC50-Werte bei mutiertem Status niedriger und befinden sich im nanomolaren Bereich. Liegt keine B-Raf^{V600E}-Mutation vor, kann sogar eine Aktivierung von ERK und MEK resultieren (Joseph *et al.*, 2010). Der Tumor, der am häufigsten eine B-Raf^{V600E}-Mutation aufweist, ist mit 66 % das maligne Melanom (Davies *et al.*, 2002). Seit 2011 ist Vemurafenib für die Therapie beim malignen Melanom bei nachgewiesener Mutation zugelassen (Zhu *et al.*, 2016). Derzeit wird es in klinischen Studien auf seine Anwendbarkeit bei Haarzellleukämie und beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom getestet (Pettirossi *et al.*, 2015; Shea *et al.*, 2016).

Der letzte ausgewählte SMI ist Regorafenib. Diese Substanz ist ein Multikinaseinhibitor mit Einfluss auf die Angiogenese, Onkogenese und die stromale Tumorumgebung. Eine Hemmung der Angiogenese wird durch Inhibition von VEGFR1-3 erzielt, die anti-onkogene Komponente kommt durch die Blockierung von B-Raf, p38MAPK, Raf-1, RET, c-Kit sowie TIE-2 zustande. Die Modifikation der Stromaumgebung des Tumors wird durch Hemmung

von FGFR-1 und PDGFR-b realisiert. Regorafenib ist oral verfügbar und zu über 99 % an Plasmaeiweiße gebunden. Es unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf und wird über CYP 3A4 und UGT1A9 metabolisiert. Je nach Zielprotein liegen die IC50 Werte im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich (Wilhelm *et al.*, 2004; Wilhelm *et al.*, 2011). Regorafenib wird zur Therapie beim metastasierten kolorektalen Karzinom eingesetzt und befindet sich derzeit in klinischer Testung bei anderen Tumoren des Magen-Darm-Traktes wie gastrointestinalen Stromatumoren und dem Ösophaguskarzinom (George *et al.*, 2012; Grothey *et al.*, 2013).

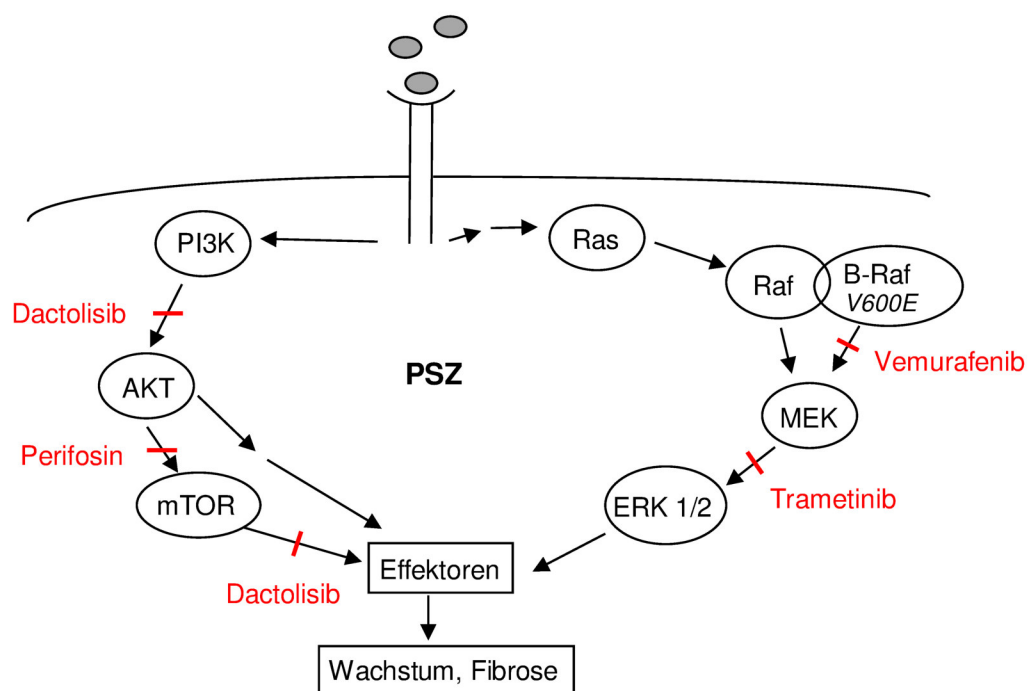


Abb. 1.2 Angriffspunkte der Inhibitoren (modifiziert nach Witteck und Jaster, 2015)

Über die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren werden verschiedene Signale in der Zelle vermittelt. Wichtige Kaskaden in PSZ sind dabei der Ras/Raf/MEK/ERK- und PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg, die in dieser Abbildung stark vereinfacht dargestellt sind. Dactolisib wirkt dual über die Inhibition der PI3-K und mTOR, Perifosin hemmt AKT. Trametinib adressiert MEK und Vemurafenib bewirkt eine Hemmung von B-Raf^{V600E}. Die Angriffspunkte des Multikinaseinhibitors Regorafenib wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit einbezogen.

1.2 Zielstellung der Arbeit

Das PK wie auch die CP sind von einer Pankreasfibrose begleitet, die entscheidenden Einfluss auf die Progression beider Erkrankungen ausübt. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass insbesondere PSZ eine Schlüsselrolle im bindegewebigen Umbau des Pankreas einnehmen. Eine gezielt modulierende antifibrotische Therapie ist aber noch nicht etabliert worden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, klinisch verfügbare Kinaseinhibitoren auf ihre antifibrotische Wirkung bei PSZ zu untersuchen. Dabei dienten sowohl immortalisierte als auch primäre Sternzellen als *in vitro* Modelle. An ihnen sollten sowohl die Effekte der SMI auf das Zellwachstum als auch zytotoxische Nebenwirkungen wie Zelltod evaluiert werden. Ein weiterer Schwerpunkt war die Analyse der molekularen Wirkungsweise auf Signaltransduktionsebene. Dazu wurden der Ras/Raf/MEK/ERK- und PI3K/AKT/mTOR-Signalweg untersucht. Die Modulation der Sternzellaktivierung und Aktivitätsparameter von PSZ wurden mittels Genexpressionsstudien analysiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen mögliche Therapieoptionen zur Behandlung der Pankreasfibrose aufweisen. Ausgehend von den *in vitro* Resultaten wäre nun die Testung der Kinaseinhibitoren im Tiermodell denkbar.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller	Seriennummer
Brutschrank (HERA cell 150)	Thermo Fisher Scientific	40862222
Echtzeit-PCR-Cycler (ViiA 7) + Software	Applied Biosystems	27882087
Elektrophoresekammer (Mini-Protean Tetra System)	Bio-Rad Laboratories	552BR 047080
Feinanalysewaage (Chyobalance JL 200)	Dynatech	90610
Flockeneisbereiter (AF 103)	Scotsmann Ice Systems	3006 ES1L
Heizblock (Test tube heater SHT1)	Bibby Scientific Limited	5278
Heizblock (Thermomixer comfort)	Eppendorf AG	5355ZK947672
Magnetrührer (MR 2002)	Eppendorf AG	-
Mikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss AG	667234
Multipette plus	Eppendorf AG	-
NanoPhotometer P-Class	Implen	6303
Odyssey Infrared Imager und Application Software Version 3.0	Li-Cor Biosciences GmbH	ODY-1790
pH-Messgerät (Five Easy FE20)	Mettler-Toledo GmbH	1229215156
Pipetboy	Integra Biosciences GmbH	625935
Pipetten (Research 0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf AG	-
Photometer (Anthos Reader 2001 (AR 8003 – 10 700))	Anthos labtec	1098
Plattenluminometer (Glomax Multidetecion System)	Promega GmbH	9,30101E+11
Plattenschüttler (MTS 4)	IKA-Labortechnik	173-05
Semi-Dry transfer cell (Trans-blot SD)	Bio-Rad Laboratories	221BR 50583
Schüttler - Rocky 3D	Labortechnik Fröbel GmbH	4024
Sterilwerkbank (KR-130)	Kojair Tech Oy	16170-3
Stromversorgungsgerät (PowerPac 1000)	Bio-Rad Laboratories	043BR 15558
UV-Messsystem	Intas	-
Vortexer (MS2 Minishaker)	IKA Labortechnik	3.112.318
Wasserbad (1083)	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH	-
Wasserbad (WiseBath)	WITEG Labortechnik GmbH	4,00701E+12
Zentrifuge (Mikro 200 R (2405))	Hettich Lab Technology	0000778-02-00
Zentrifuge (Rotina 46 R (4610))	Hettich Lab Technology	0003058-01-00

2.1.2 Allgemeine Labormaterialien

Material	Hersteller
15 ml Röhrchen, 50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One
96 half-area Kulturplatten	Greiner Bio-One
Deckgläschen	Carl Roth GmbH + Co. KG
Dual Filter Tips 0,1-1000 µl	Eppendorf AG
Erlenmeyerkolben	Kavalierglass, Co. Ltd
Kulturplatten (6-, 12-, 24 Wells)	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen (0,1-1000 µl)	Eppendorf AG
PVDF-Transfermembran	Merck Millipore
Reaktionsgefäße (0,6 ml; 1,5 ml; 2 ml; 5 ml)	Eppendorf AG
Sterile Pipetten 5 und 10 ml	Greiner Bio-One
Whatman-Papier	Carl Roth GmbH + Co. KG
Zählkammer Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG

2.1.3 Reagenzien und Lösungen für die Zellkultur

Reagenz/Lösung	Anmerkung	Hersteller
Dactolisib	in DMSO gelöst, Stammlösung \triangleq 1 mM	Selleckchem
Fetales Kälberserum (FKS)	Hitzeinaktivierung bei 56 °C für 30 min	PAA Laboratories GmbH
Iscove Basal Medium	enthält 3,024 g/l NaHCO ₃ , stabiles Glutamin	Biochrom
nicht essentielle Aminosäuren (NEA, 100x)		Gibco
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS, 10x)	pH 7,4; mit Aqua dest. verdünnt	Gibco
Penicillin-Streptomycin Stammlösung (100x)	10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin	Gibco
Perifosin	in Ethanol gelöst, Stammlösung \triangleq 10mM	Selleckchem
Regorafenib	in DMSO gelöst, Stammlösung \triangleq 10 mM	Selleckchem
Trametinib	in DMSO gelöst, Stammlösung \triangleq 10 mM	Selleckchem

Trypanblau		Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin-EDTA	0,05 % in PBS angesetzt	Gibco
Vemurafenib	in DMSO gelöst Stammlösung \pm 20 mM	Selleckchem

2.1.4 Lösungen für die Zellproliferationsmessung

Reagenz	Anmerkung	Hersteller
Zellproliferation - ELISA, BrdU (<i>colorimetric</i>)	enthält BrdU-Reagenz, Fix-Denat, Antikörper Dilutionslösung, Anti-BrdU-POD, Waschpuffer-ansatz, Substratlösung	Roche Diagnostics GmbH
Schwefelsäure	1 M, als Stopplösung verwendet	

2.1.5 Lösungen für die Zytotoxizitätsmessung

Reagenz	Anmerkung	Hersteller
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	enthält Analysepuffer, AAF-Glo Substrat, Digitonin	Promega GmbH

2.1.6 Lösungen und Antikörper für die Proteinanalytik

Primärantikörper	Quelle	Hersteller	Katalognummer
AKT	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling Technology	# 4691
α -SMA	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	A 2547
ERK (p44/42 MAP Kinase)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology	# 9102
GAPDH	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling Technology	# 2118
p70S6-Kinase	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling Technology	# 5707
Phospho-AKT	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling Technology	# 4060

Phospho-ERK (Phospho-p44/42 MAP Kinase)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology	# 9102
Phospho-p70S6-Kinase	Kaninchen monoklonal	Cell Signaling Technology	# 9234

Sekundärantikörper	Quelle	Hersteller	Katalognummer
IRDye 680CW Anti-Maus Ig	Ziege, polyklonal	Li-Cor Biosciences GmbH	926-32220
IRDye 800CW Anti-Kaninchen Ig	Ziege, polyklonal	Li-Cor Biosciences GmbH	926-32211

Reagenz	Anmerkung	Hersteller
40 % Acrylamid/ Bis-Solution, 29:1		Bio-Rad Laboratories
Ammoniumpersulfat (APS)	APS 10 %: 100 mg Ammoniumpersulfat in 1 ml Aqua dest. gelöst	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Anodenpuffer 1	pH 10,4 18,17 g Tris (300 mM) 100 ml Methanol (20 %) → ad 500 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG J.T.Baker
Anodenpuffer 2	pH 10,4 1,514 g Tris (25 mM) 100 ml Methanol (20 %) → ad 500 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG J.T.Baker
Blocklösung 5x	10 ml Blocklösungskonzentrat → ad 50 ml PBS 0,0125 - 0,025 g Natriumazid	Rockland Immunochemicals Gibco Riedel-de-Haën
Elektrophoresepuffer 3x	81,81 g Tris 380,7 g Glycin 27,00 g SDS → ad 9 l Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG Carl Roth GmbH + Co. KG Carl Roth GmbH + Co. KG
Kathodenpuffer	pH 9,4 1,514 g Tris (25 mM) 0,376 g Glycin (40 mM) 100 ml Methanol (20 %) → ad 500 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG Carl Roth GmbH + Co. KG J.T.Baker

Probenpuffer	2 % SDS 10 % Glycerin 5 mM EDTA, pH 8 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,001 % Bromphenolblau 5 % β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG Carl Roth GmbH + Co. KG Applichem Carl Roth GmbH + Co. KG Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Proteinmarker <i>prestained, Broad Range</i>		New England Biolabs GmbH
Sammelgelpuffer	pH 6,8 6,06 g Tris 0,40 g SDS → ad 100 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG Carl Roth GmbH + Co. KG
Strippuffer	pH 2,0 1,8 g Glycin 20 g SDS → ad 1000 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG Carl Roth GmbH + Co. KG
Transferpuffer	6,0 g Tris 29,0 g Glycin 10 % Methanol → ad 2000 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG Carl Roth GmbH + Co. KG J.T.Baker
Tetramethylethylendiamin (TEMED)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trenngelpuffer	pH 8,8 36,33 g Tris 0,80 g SDS → ad 200 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG Carl Roth GmbH + Co. KG
Tween-20		Carl Roth GmbH + Co. KG

2.1.7 Lösungen für die Nukleinsäureanalytik

Reagenz	Anmerkung	Hersteller
Agarose		Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<i>Assay on demand (Acta2; α-smooth muscle actin; α-SMA)</i>	Rn01759928_g1	Life Technologies
<i>Assay on demand (α1 type I collagen, Col1a1)</i>	Rn01527840_m1	Life Technologies
<i>Assay on demand (cyclin D1; Ccnd1)</i>	Rn00432360_m1	Life Technologies
<i>Assay on demand (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; Cdkn1A)</i>	Rn00589996_m1	Life Technologies
<i>Assay on demand (IL-6)</i>	Rn00561420_m1	Life Technologies

<i>Assay on demand (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; Hprt)</i>	Rn01527840_m1	Life Technologies
<i>Assay on demand (Tgf-β1)</i>	Rn00572010_m1	Life Technologies
Chloroform		Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DEPC-H ₂ O	mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat versetztes Aqua dest., vor Gebrauch 20 min autoklaviert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<i>DNA-free DNase Treatment & Removal DNase Inactivation Reagent</i>	enthält DNase I Puffer, rDNase I 2 U/ μ l, nukleasefreies Wasser	Ambion by Life technologies
Ethanol 96 %		Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethidiumbromid		Invitrogen
<i>High capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	enthält Random Primer, Reverse Transkriptase, dNTP-Gemisch, RT Puffer, nukleasefreies Wasser	Applied Biosystems
<i>High-densityTBE-Sample Buffer (5x)</i>		Life Technologies
<i>GeneRuler 1 kb DNA Ladder</i>		Fisher Scientific GmbH
<i>MasterMix FastStart Universal Probe Master (Rox)</i>		Roche Diagnostics GmbH
<i>TriFast</i>		PEQLAB Biotechnologie GmbH
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE, 10x)		

2.1.8 Lösungen für die IL-6 Bestimmung

Reagenz	Anmerkung	Hersteller
Legend Max ELISA Kit mit vorbeschichteten Platten für Ratten IL-6	enthält Analysepufer A, Avidin HRP A, IL-6-Detektions-antikörper, Substratlösung, Stopplösung	BioLegend

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendete Zellen

Für die Zellkulturarbeiten wurden sowohl immortalisierte als auch primäre PSZ der Ratte verwendet. Bei den immortalisierten Zellen handelt es sich um eine immortalisierte LTC-7-Zelllinie, die durch retroviralen Gentransfer der „SV-40 large T-antigen encoding region“ generiert wurde (Sparmann *et al.*, 2004; Jaster *et al.*, 2005). Die primären PSZ stammten aus zwölf ca. drei Monate alten männlichen Lewis-Ratten (Charles River Wiga Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Für die Gewinnung der Zellen wurden die Pankreata mit einem Gemisch aus Kollagenase P (0,05 %), Protease IX (0,02 %) und Desoxyribonuklease (0,1 %) in *Hank's buffered salt solution* behandelt. Die Auftrennung der unterschiedlichen Zellpopulationen erfolgte mittels Nycodenz-Dichtegradientenzentrifugation (Jaster *et al.*, 2002; Apte *et al.*, 1998). Dabei setzten sich die PSZ aufgrund ihres hohen Lipidgehalts als ringförmige Fraktion oberhalb des Zell- und Debris pellets ab. Sie wurden als frisch isolierte Zellen in Einfriermedium (90 % FKS, 10 % DMSO) resuspendiert, bei – 150 °C in einer Tiefkühltruhe gelagert und bedarfsgerecht in Kultur genommen. Die Kontamination mit anderen Zellen des Pankreas reduzierte sich mit jedem Mediumwechsel auf schließlich unter 5 %, da PSZ im Gegensatz zu Azinuszellen an Plastikoberflächen adhären können. Hinzu kam die hohe proliferative Aktivität kultivierter PSZ, die zu einem raschen Überwachsen anderer adhärenter Zellen, wie Monozyten/Makrophagen, führte. Die PSZ wurden von Mitarbeitern der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Jaster zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen mittels Sterilwerkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Dem Kulturmedium (500 ml) wurden 5 ml NEA und 5 ml Penicillin/Streptomycin sowie FKS hinzugefügt. Der Anteil an FKS richtete sich nach den verwendeten Zellen. Bei den LTC-7 Zellen wurde Medium mit 10 % FKS und bei den Primärzellen Medium mit 17 % FKS verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen in einem Inkubator bei 37 °C, einer Kohlenstoffdioxidbegasung von 5 % sowie einer wassergesättigten Atmosphäre. Soweit nicht anders angegeben, unterschied sich der Versuchsablauf zwischen immortalisierten und primären PSZ nicht. Die Anzahl der für einen Versuch eingesetzten Zellen wurde dabei so gewählt, dass die unbehandelten Zellen der Kontrolle während des Versuches nicht konfluent wuchsen.

Die Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in ihr Kulturmedium überführt. Anschließend wurden die Zellen kurz zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde entfernt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Nun wurden die Zellen auf einer

6-Well-Kulturplatte ausgesät. Das Wachstum der Zellen wurde täglich mikroskopisch kontrolliert. Falls nötig, erfolgte ein Mediumwechsel. Bei einer Wellkonfluenz von ca. 90 % wurden die Zellen passagiert. Die LTC-7-Zellen wurden bis zu zehnmal passagiert, bei den Primärzellen erfolgte eine Passagierung bis zu zweimal. Dazu wurde das Medium abpipettiert und das Well mit PBS gespült. Die Zugabe von 0,05 % Trypsin diente der enzymatischen Adhäsion der Zellen. Die Einwirkzeit des Trypsins betrug 5 min bei Standardkulturbedingungen. Zeigten sich die Zellen danach unter dem Mikroskop als abgerundet, wurden die Zellen wieder in Medium aufgenommen und für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit frischem Medium resuspendiert und dieselbe Menge Zellsuspension und Trypanblau für die Zellzählung in Neubauerzählkammern eingesetzt. Danach erfolgte die Einsaat der Zellen für die Versuche.

2.2.3 Quantifizierung des Zellwachstums

Die Proliferationsleistung von Zellen spiegelt sich in ihrer DNA-Syntheseleistung wider. Das synthetische 5-Brom-2-Desoxyuridin (BrdU) kann in der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNA von sich teilenden Zellen eingebaut werden. Mittels fluoreszenzmarkiertem Anti-BrdU kann die Menge des eingebauten BrdU photometrisch detektiert werden. Dieser BrdU-Einbau dient somit als Maß für die Zellproliferation. Um diesen Parameter bewerten zu können, wurde ein weiterer Versuch zur Zytotoxizität der Inhibitoren durchgeführt (siehe 2.2.4).

Für diesen Versuch wurden jeweils 1.000 LTC-Zellen bzw. 2.000 primäre PSZ pro Well auf einer 96-Well-Kulturplatte eingesät. Nach Adhäsion der Zellen über Nacht erfolgte die Zugabe der Inhibitoren durch einen Mediumwechsel. 24 h später wurde BrdU in einer Endkonzentration von 10 µmol/l eingesetzt. Nach weiteren 24 h wurde die Inkubation mit dem Inhibitor und BrdU beendet und der Versuch ausgewertet. Dazu wurde die DNA denaturiert, um sie dem Anti-BrdU-Antikörper zugänglich zu machen. Dieser Antikörper ist an eine Peroxidase gekoppelt, die die Umwandlung des anschließend hinzugegebenen Substrates in ein fluoreszierendes Produkt katalysiert. Die Menge des in die DNA eingebauten BrdUs korreliert dabei mit der Menge des entstehenden Produktes. Die Peroxidasereaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure (1 M) beendet und die Extinktion des fluoreszierenden Produktes bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen.

2.2.4 Quantifizierung der Zytotoxizität

Sowohl eine Hemmung der Zellproliferation als auch Zelltod senken den oben beschriebenen BrdU-Einbau. Um den Einfluss der Inhibitoren auf den Zelltod zu evaluieren, wurde der *CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay* angewendet. Dieser Assay macht sich zunutze, dass tote Zellen ihre Membranintegrität verlieren und dabei Proteasen freisetzen, die mittels Lumineszenzverfahren detektiert werden können.

In diesem Versuch wurden jeweils 1.000 LTC-Zellen bzw. 2.000 primäre PSZ pro Well auf einer 96-Well-Platte eingesetzt. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe des Inhibitors mittels Mediumwechsel (50 µl/Well). Zusätzlich wurde als Positivkontrolle der Effekt des pro-apoptischen Staurosporins untersucht. Nach 48 h unter Inhibitor- bzw. Staurosporineinwirkung wurde jedem Well 25 µl *CytoTox-Glo Cytotoxicity Assayreagenz* hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Substrat reagiert mit den von toten Zellen freigesetzten Proteasen unter Bildung eines lumineszierenden Komplexes. Diese Lumineszenz wurde mittels Glomax Multidetektionssystem gemessen. Da das Assayreagenz intakte Membranen lebender Zellen nicht durchdringen kann, erfolgte nun die Lyse aller vitalen Zellen durch Zugabe einer 0,66 %igen Digitoninlösung. Die dadurch freigesetzten Proteasen können nun auch eine lumineszierende Verbindung mit dem Assayreagenz eingehen. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine weitere Lumineszenzmessung. Da dieser Wert nun mit der Gesamtzellzahl korrespondiert, kann der Anteil vitaler Zellen durch Subtraktion der Lumineszenz der toten Zellen (1. Messung) von der der Gesamtzellzahl (2. Messung) berechnet werden.

2.2.5 Proteinanalytik

2.2.5.1 Probengewinnung

Die Zellen wurden für diesen Versuch auf 24-Well-Platten ausgesät. Hierbei gab es zwei unterschiedliche Versuchsabläufe. Das eine Versuchsprotokoll sah vor, die Zellen für 48 h mit oder ohne den jeweiligen Inhibitor mit serumhaltigem Medium zu behandeln, sobald die Zellen Subkonfluenz im Well erreichten. Im zweiten Versuchsprotokoll erfolgte ein Mediumwechsel mit serumfreiem Medium. Dieses verblieb für 15 h über Nacht auf den Wells. Erst danach wurde der Inhibitor (in serumfreiem Medium verdünnt) in das noch im Well befindliche Medium hinzugegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde mit der Restimulation der Zellen begonnen. Dabei wurde so viel FKS zum serumfreien Medium hinzugefügt, dass der resultierende FKS-Gehalt bei den LTC-Zellen 10 % und bei den primären PSZ 17 % betrug. Die Restimulation geschah zeitversetzt, sodass zunächst die 60-minütige, später die 20- und 5-minütige FKS-Restimulation erfolgten und damit alle Proben zeitgleich geerntet werden

konnten. Bei einigen Wells wurden die Zellen nicht restimuliert (0 min Probe). Für jeden Inhibitor, genauso wie für die korrespondierende Kontrolle, wurde eine Serie bestehend aus 0 min, 5 min, 20 min und 60 min Restimulation erstellt.

Die Probengewinnung verlief bei beiden Versuchsabläufen identisch. Dazu wurde nach der Entfernung des Mediums 75 µl vorgewärmter Probenpuffer je Well hinzugefügt und die Probe in ein Reaktionsgefäß überführt. Dieser Probenpuffer enthielt Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) in einer Endkonzentration von 2 %. Dabei handelt es sich um ein anionisches Tensid, welches an hydrophobe Bereiche der Proteine bindet und im Komplex zu einer Negativierung der Ladung führt. Zusammen mit dem ebenfalls im Puffer enthaltenen 5 %igen β -Mercaptoethanol zerstört das SDS die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine. Eine weitere Eigenschaft des β -Mercaptoethanols ist die Reduktion vorhandener Disulfidbrücken. Somit hängt die Auftrennung der Proteine in der später folgenden Gelelektrophorese lediglich von ihrer molaren Masse ab. Nach Überführung in ein Reaktionsgefäß wurden die Proben für 5 min bei 95 °C gekocht, um vorhandene Proteasen zu inaktivieren und anschließend für weitere 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die so gewonnenen Proteinproben wurden bis zum Gelauftrag bei -20 °C gelagert.

2.2.5.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Verfahren der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Durch eine Gelmatrix wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode. Diese Gelmatrix bestand aus zwei unterschiedlichen Gelen, um schärfere Banden zu erhalten. Zunächst wanderten die Proteine ohne Auftrennung durch das Sammelgel. An der Grenze zum Trenngel erfolgte die Fokussierung der Proben. Das 8 %ige Trenngel besaß kleinere Poren als das Sammelgel. Kleinere Proteine konnten diese Poren einfacher als größere Proteine passieren, wodurch eine Auftrennung der Eiweiße nach dem Molekulargewicht erfolgte.

Bestandteil	Kleines Gel (7,06 ml)	Großes Gel (33,07 ml)
H ₂ O	3,12 ml	14,70 ml
Trenngelpuffer	1,75 ml	8,25 ml
Acrylamidstammlösung 40 %	2,10 ml	9,90 ml
10 % APS	75,00 µl	0,20 ml
TEMED	15,00 µl	20,00 µl

Tab. 2.1: Trenngelzusammensetzung

Bestandteil	Kleines Gel (1,55 ml)	Großes Gel (8,24 ml)
H ₂ O	950,0 µl	5,1 ml
Sammelgelpuffer	400,0 µl	2,1 ml
Acrylamidstammlösung 40 %	187,5 µl	1,0 ml
10 % APS	10,0 µl	30,0 µl
TEMED	5,0 µl	10,0 µl

Tab. 2.2: Sammelgelzusammensetzung

Das später durchgeführte *Blotting*-Verfahren bestimmte die Größe der verwendeten Gele. Beim *Semi-Dry*-Verfahren kamen kleine Gele zum Einsatz. Damit wurden die Proteine des PI3-K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges sowie des Aktivierungsmarkers α -SMA analysiert. Um die Proteine des p70-S6-Kinase-Signalweges quantifizieren zu können, war eine stärkere Proteinauftrennung notwendig, weshalb große Gele Anwendung fanden. Zunächst wurde das Trenngel in vorbereitete Glaskammern bis ca. 1 cm unterhalb der späteren Auftragetaschen gegossen und die Grenzschicht mit Aqua dest. überschichtet. Nach erfolgter Auspolymerisation des Gels wurde das Wasser wieder entfernt und das Sammelgel hinzu gegossen. In dieses wurde ein Kamm für die Auftragetaschen eingesetzt. Sobald das Sammelgel auspolymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und die Glasplatten in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Das Auftragen der Proben erfolgte mit jeweils 10 µl bei den kleinen Gelen bzw. 30 µl bei den großen Gelen. Pro Gel wurde auch ein Protein-Molekulargewichtsmarker mit 3 µl (kleines Gel) bzw. 20 µl (großes Gel) eingesetzt. Bei einer Spannung von 200 V wurde nun die Elektrophorese durchgeführt, bis die Laufront die Unterkante der Glasplatte erreichte.

2.2.5.3 Proteintransfer auf eine Membran

In diesem Schritt erfolgte die Übertragung der Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) mittels *Semi-Dry*- bzw. *Tankblot*-Verfahren. Dazu wurde beim *Semi-Dry-Blotting* ein elektrisches Feld mit 250 mA pro Gel (max. 25 V) senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung der Proteine für eine bis anderthalb Stunden angelegt. Dabei befand sich das Gel über der Membran, wodurch die Proteine nach unten übertreten konnten und in der Membran gebunden wurden. Umgeben wurden Gel und Membran von in unterschiedlichen Puffern getränkten Whatman-Filterpapieren, die als Ionenreservoir dienten. Ganz unten befanden sich zwei Lagen von in Anodenpuffer 1 und eine Lage von in Anodenpuffer 2 inkubiertem Filterpapier. Darüber folgte die zuvor in Methanol, Aqua dest. und

Anodenpuffer 2 vorbehandelte Membran. Auf diese wurde dann das Proteingel gelegt und mit drei mit Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren bedeckt.

Im Gegensatz dazu findet das *Tankblot*-Verfahren in ausschließlich feuchter Umgebung statt. Auch hier wurde die PVDF-Membran mit Methanol und Aqua dest. äquilibriert, bevor die Membran im *Transfer-Sandwich* platziert wurde. Dabei handelte es sich um ein Konstrukt aus Schwamm-Papier-Gel-Membran-Papier-Schwamm. Dieses *Sandwich* wurde vertikal in den Tank-Blot gestellt und mit Transferpuffer umgeben. Der *Blotting*-Vorgang wurde über Nacht bei 200 mA und einer Umgebungstemperatur von 4 °C durchgeführt.

Nach Ablauf des Proteintransfers wurde die Membran zunächst kurz in PBS gewaschen und danach für eine Stunde oder bei 4 °C über Nacht in Blocklösung (mit PBS verdünnt) inkubiert, um freie Bindungsstellen zu besetzen.

2.2.5.4 Spezifischer Proteinnachweis (Immunoreaktion)

Nach dem Blocken der Membran wurde nun der Primärantikörper hinzugegeben. Dieser wurde nach Herstellerangaben in der Blocklösung mit 0,1 % Tween20 verdünnt und verblieb über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln auf der Membran. Der Primärantikörper bindet dabei an das gesuchte Protein. Nun wurde die Membran viermal mit PBS mit 0,1 % Tween20 gewaschen, um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, bevor die Zugabe des fluoreszierenden Sekundärantikörpers erfolgte. Dieser war gegen Maus- oder Kaninchen-IgG gerichtet und mit den Fluoreszenzfarbstoffen IRDye 680CW (rot) bzw. 800CW (grün) markiert. Der Sekundärantikörper verblieb für 30 min bei Raumtemperatur auf der Membran. Danach wurde die Membran wieder viermal mit PBS mit 0,1 % Tween20 und einmal mit PBS gewaschen, um letzte Rückstände des Sekundärantikörpers zu entfernen.

2.2.5.5 Detektion mittels Odyssey Infrared Imaging System

Zur Auswertung dieses Versuchs erfolgte die Detektion und Quantifizierung der Signale am *Odyssey Infrared Imaging System* (Softwareversion 3.0). Dazu wurde eine Anregungswellenlänge von 800 nm für IRDye 800CW und 680 nm für IRDye 680CW ausgewählt.

Um die Membran danach mit weiteren Primärantikörpern inkubieren zu können, wurde der nun noch gebundene Antikörper mittels Stripping-Buffer für zweimal 15 min bei 65 °C im Wasserbad abgelöst. Daraufhin wurde die Membran viermal für 10 min mit PBS gewaschen und für eine Stunde unter leichtem Schütteln mit Blocklösung inkubiert, bevor der nächste Primärantikörper hinzugegeben werden konnte. Die Analyse des *house-keeping* Proteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente der Detektion von

Ladungsunterschieden. Zur Bestimmung des Aktivierungszustandes der Signalwege wurde der Quotient der Signalintensitäten aus phosphoryliertem und korrespondierendem Gesamtprotein gebildet, wohingegen der Aktivierungsmarker α -SMA mit dem *house-keeping* Protein abgeglichen wurde. Einzelheiten dazu sind in den jeweiligen Abbildungslegenden beschrieben.

2.2.6 Nukleinsäureanalytik

Diese Versuche dienten dazu, Inhibitoreffekte auf die wichtigen Gene der Sternzellaktivierung und der Zellzyklusregulation zu untersuchen. Hierbei wurden nur Versuche an primären PSZ durchgeführt, indem diese für 24 h mit dem jeweiligen Inhibitor- bzw. Kontrollmedium inkubiert wurden. Es folgten die Isolation der RNA und ihre Umschreibung in cDNA mittels Reverser Transkriptase, woran sich die Quantifizierung der Expression individueller Gene durch die Anwendung der *TaqMan*-Technologie anschloss.

2.2.6.1 Isolation der RNA

Zunächst wurde das Medium aus den Vertiefungen der 12-Well-Platte entfernt und die Zellen mit jeweils 250 μ l TriFast vom Plattenboden abgelöst und lysiert, um sie in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß zu überführen. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 60 μ l Chloroform zu den lysierten Zellen. Nach Durchmischung des Gefäßinhaltes und einer zehnminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 24.100 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Dadurch setzte sich eine wässrige Phase ab, die in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Diese oben liegende farblose Phase enthält die Gesamt-RNA und wurde im Folgenden mit 150 μ l Isopropanolol je Reaktionsgefäß für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor eine Zentrifugation der Proben für 10 Minuten erfolgte. Der hierbei entstandene Überstand wurde entfernt und jeweils 1 ml Ethanol (75 % mit DEPC-Wasser versetzt) zum abgesetzten RNA-Pellet hinzugegeben. Nach erneuter, diesmal fünfminütiger Zentrifugation wurde der Ethanol-Überstand möglichst vollständig entfernt und das Pellet für etwa 15 min getrocknet. Nun konnte es in 20 μ l 0,1 % igem DEPC-Wasser aufgenommen werden und für 10 Minuten bei 65 °C inkubieren. Die so isolierte RNA konnte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

2.2.6.2 DNase-Verdau

Um eventuell noch bestehende DNA-Reste zu entfernen, erfolgte der DNase Verdau. Dabei wurden jeweils 1 μ l DNase-Puffer und 1 μ l rDNase zu den Proben hinzugegeben. Die Enzyme

verblieben für 30 min bei 37 °C auf den Proben, bevor die Reaktion mit 1 µl DNase-Inaktivierungsreagenz beendet wurde. Dieses wurde für 2 min unter gelegentlichem Schütteln mit den Proben inkubiert und setzte sich nach einer folgenden Zentrifugation bei 9.300 x g für 1,5 min am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Der DNA-freie RNA-Überstand konnte nun in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden.

2.2.6.3 Quantitative RNA-Bestimmung

Um in der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) definierte RNA-Mengen einsetzen zu können, wurde nach jeder Isolation der RNA-Gehalt der Probe mit einem Nanophotometer bestimmt. Dabei macht man sich zunutze, dass die RNA UV-Licht im Bereich von 230 bis 260 nm absorbieren kann. Zum einen kann man hierdurch die RNA-Konzentration ermitteln, zum anderen ist aber auch eine Aussage über die Reinheit der RNA möglich. Darüber gibt der Quotient der bei Wellenlängen von 260 und 280 nm gemessenen Extinktionen Auskunft. Nukleinsäuren besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, Phenole und Proteine hingegen bei 280 nm. Der Extinktions-Quotient 260/280 nm sollte bei mindestens 1,8 liegen, da darunterliegende Werte für eine starke Kontamination der RNA mit Proteinen sprechen.

2.2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Qualität der RNA zu überprüfen, erfolgte eine Analyse der Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurde 1,5 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und mit TBE-Puffer (0,5 x in DEPC-Wasser) auf ein Volumen von 150 ml aufgefüllt. Die so entstandene Lösung wurde für 2 min in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden 1,5 µl Ethidiumbromid (1:100.000) hinzugegeben und der Kolbeninhalt durch Schwenken durchmischt. Das 1% ige Agarosegel kühlte während der folgenden 15 min ab und konnte dann in eine bereits vorbereitete Gelkammer mit eingesetztem Taschenkamm gegossen werden.

Während das Gel auspolymerisierte wurde 1 µg der zu untersuchenden RNA mit 3 µl TBE-*Sample-Buffer* (5x) vermischt. Hierzu wurden 11 µl DEPC-freies Wasser pipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von 15 µl resultierte. Das nun ausgehärtete Agarosegel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt und mit TBE-Puffer überschichtet. Nach Entfernung des Taschenkamms wurden 15 µl Reaktionsansatz pro Tasche eingesetzt. Ebenfalls wurden 10 µl *DNA ladder 1 kb* pro Gel aufgetragen. Die Auftrennung der RNA nach ihrer Größe erfolgte bei einer Spannung von 100 V und einer Laufzeit von 30 min. Anschließend konnte das Agarosegel mit der Software *Gel Imager* unter einwirkendem UV-Licht ausgewertet werden.

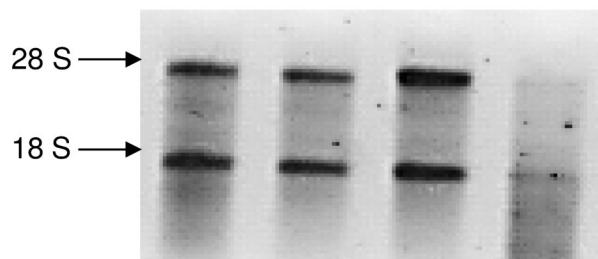


Abb. 2.1: Gelelektrophorese von 1 µg RNA in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel

Erkennbar sind die undegradierten ribosomalen Banden der 18 S und 28 S RNA. Bei degradierter RNA (rechts im Bild) sind keine klaren Banden abgrenzbar.

2.2.6.5 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription

Bei der Reversen Transkriptase (RT) handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die die Umschreibung von RNA in cDNA ermöglicht. Durch ebenfalls hinzugegebene Primer kann so aus der mRNA unter Einwirkung der RT ein komplementärer DNA-Basenstrang entstehen, der mittels RNase - H von der mRNA abgetrennt wird.

Für dieses Verfahren wurden 0,25 µg RNA mit DEPC-Wasser bis zu einem Endvolumen von 10 µl verdünnt. Dazu wurden 10 µl Mastermix pipettiert.

Bestandteil	Menge für 1 Probe (10 µl)
10x Puffer	2,0 µl
dNTPs	0,8 µl
Random Primer	2,0 µl
RT	1,0 µl
DEPC-Wasser	4,2 µl

Tab. 2.3: Mastermix-Zusammensetzung

Die RT-PCR lief in drei Phasen ab: Zunächst erfolgte die Inkubation des Reaktionsgemisches bei 25 °C für 10 min. Für weitere zwei Stunden wurde eine Umgebungstemperatur von 37° C geschaffen, bevor die Reaktion durch fünfminütige Anwendung von 85 °C beendet wurde. Bis zur weiteren Verwendung konnten die Proben nun bei -20 °C gelagert werden.

2.2.6.6 Quantitative Echtzeit-PCR (TaqMan)

Diese Methode erlaubt es, quantitative Aussagen über Transkripte von Zielgenen in einer Probe zu treffen. In einem Arbeitsschritt werden die Amplifikation, die Detektion des PCR-Produkts (*polymerase chain reaction*) und dessen Quantifizierung miteinander verbunden.

Für jedes Zielgen-Transkript findet eine entsprechende fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonde Anwendung. Diese verhält sich zu dem zu analysierenden cDNA-Abschnitt komplementär und liegt zwischen zwei im Reaktionsansatz ebenfalls enthaltenen Primern. Die Sonde ist an ihrem 5' Ende mit einem Reporterfarbstoff und an ihrem 3' Ende mit

einem Quencher verbunden. Dieser sorgt für eine Unterdrückung des Fluoreszenzsignals, solange die Sonde intakt ist. Die Primer können durch die Taq-Polymerase verlängert werden. Dabei handelt es sich um ein aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliertes Enzym, welches über eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität verfügt. Kommt es nun zur Spaltung der Sonde, verliert der Quencher die räumliche Nähe zum Reporterfarbstoff und dieser kann fluoreszieren. Die Fluoreszenzstärke korreliert dabei mit der Konzentration des PCR-Produktes. Es gibt einen Zeitpunkt, ab dem der Anstieg des Signals exponentiell verläuft. Damit kann man Rückschlüsse auf die Anfangskonzentration der zu quantifizierenden RNA ziehen. Konkret erfolgte hierzu mit Hilfe der Software des Echtzeit-PCR-Cyclers eine Bestimmung des so genannten Ct-Wertes, der den Beginn der exponentiellen Phase der PCR markiert (t steht dabei für *threshold*). Zum Ausgleich von probenspezifischen Unterschieden in der Gesamt-RNA-Menge wurde das *house-keeping* Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) eingesetzt.

Für die qPCR wurden 96-well-Multititerplatten verwendet. Ebenfalls gebraucht wurden ein PCR-Mastermix und genspezifische Kombinationen aus Sonde und Primer („*Assays-on-demand*“).

Bestandteil	Menge für 1 Probe (12,5 µl)
Primer/Sonden-Kombination	0,625 µl
DEPC-Wasser	3,125 µl
Mastermix	6,250 µl
cDNA	2,500 µl

Tab. 2.4: Zusammensetzung PCR-Ansatz

Nachdem dieser PCR-Ansatz in jedes Well pipettiert worden war, konnte die Multititerplatte mit einer vor Verdunstung schützenden Folie abgedeckt werden. Die Platte wurde kurz anzentrifugiert und in den Echtzeit-PCR Cycler eingesetzt. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

95 °C	10:00 min	1x
95 °C	00:15 min	} 50x
60 °C	01:00 min	

Die relative Expression des Zielgens im Vergleich zum *house-keeping* Gen ließ sich wie folgt berechnen:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{HPRT}} .$$

Um relative Quantifizierungen zu erhalten, erfolgte der Bezug zur unbehandelten Kontrolle:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}} .$$

Zur Berechnung der relativen Mengen an Zielgen-mRNA fand folgende Formel Verwendung:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} .$$

2.2.7 Analyse des IL-6-Gehaltes mittels ELISA

Für die Quantifizierung der IL-6-Konzentration im Kulturmedium wurden primäre PSZ für 48 h mit oder ohne den jeweiligen Inhibitor behandelt. Nach dieser Zeit wurde das Medium abpipettiert und für 20 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei - 80 °C gelagert.

Für die Auswertung der Proben wurde ein kommerzielles IL-6-ELISA-Kit verwendet. Auf dem Boden der Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte waren bereits gegen IL-6 gerichtete *coat*-Antikörper gebunden. Zu den Wells wurden jeweils 50 µl der Probe bzw. 50 µl der nach Herstellerangaben hergestellten Verdünnungen eines mitgelieferten IL-6-Standards pipettiert. Während der zweistündigen Inkubationszeit unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur konnte das IL-6 des Probenmaterials eine Bindung mit dem Antikörper eingehen. Nachfolgend wurde der Inhalt der Wells entfernt und die Platte viermal mit Waschpuffer behandelt, um nicht gebundene Mediumbestandteile zu entfernen. Im Folgenden wurden jeweils 100 µl eines biotinylierten Detektionsantikörper hinzugegeben. Dieser wurde ebenfalls während der einstündigen Inkubationszeit an das Antigen (IL-6) gebunden, wodurch ein Antikörper-Antigen-Antikörperkomplex entstand, der der Methode den Namen *Sandwich-ELISA* verlieh. Überschüssiger Detektionsantikörper wurde durch viermaliges Waschen entfernt, bevor Avidin-HRP-A- Lösung für 30 min hinzugegeben wurde. Das Avidin ging eine Bindung mit dem Biotin des Sekundärantikörpers ein. Das im folgenden Schritt hinzugegebene Substrat (100 µl pro Well) wurde nachfolgend durch die Avidin-gekoppelte Peroxidase umgesetzt, woraus ein Farbumschlag resultierte. Nach zehnminütiger Inkubation im Dunkeln wurden 100 µl Stopplösung hinzugegeben und die Absorption bei 450 nm am Photometer (Anthos Reader 2001) gemessen. Die Messwerte wurden mit der Software *ELISAanalysis.com* ausgewertet.

2.3 Statistische Auswertung

Alle dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) angegeben. Die Analyse statistischer Signifikanzen erfolgte mit dem Programm *IBM SPSS Statistics 20.0*. Eingesetzt wurden der Kruskal-Wallis-Test mit darauffolgendem U-Test nach Mann und Whitney als nichtparametrischer Test. Lediglich bei der Bestimmung von statistischen Signifikanzen der Daten der IL-6-Analyse mittels ELISA (siehe 3.2.10) wurde die einfaktorielle ANOVA verwendet. In allen Fällen wurde das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ mittels Bonferroni-Korrektur für den jeweiligen Versuch angepasst.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der LTC-7-Zellen

LTC-7-Zellen sind durch retroviralen Gentransfer aus PSZ entstandene immortalisierte Zellen. Im Vergleich zu Primärzellen produzieren LTC-7-Zellen weniger α -SMA, welches auch nicht in der typischen Faserstruktur angeordnet wird. Daher ist dieser Phänotyp charakteristisch für den frühen Übergang von ruhenden zu aktivierten PSZ. Durch den Gentransfer unbeeinflusst bleibt aber das Ansprechen der Zellen auf Mediatoren zur Regulation der Zellproliferation (Sparmann *et al.*, 2004). Hinzukommt, dass LTC-7-Zellen unbegrenzt verfügbar und gut zu kultivieren sind. Daher eigneten sie sich, um in ersten Versuchen die Effekte der ausgewählten Kinaseinhibitoren auf PSZ zu untersuchen. Es sollte festgestellt werden, welche Inhibitoren wirksam die Zellproliferation hemmen, ohne dabei zytotoxisch zu sein. Ebenfalls überprüft wurde die Fähigkeit der SMI, den von ihnen adressierten Signalweg effektiv hemmen zu können. All diese Versuche dienten dazu, die optimale Dosierung der Inhibitoren zu finden, um diese dann in Studien an primären PSZ anwenden zu können.

3.1.1 Beeinflussung der Zellproliferation durch Kinaseinhibitoren

Zur Analyse des Wachstums von LTC-7-Zellen unter SMI-Einwirkung erfolgten Proliferationsassays unter Verwendung des Einbaus von BrdU in die DNA, wie im Methodenteil beschrieben. Dabei wurde ersichtlich, dass lediglich drei der vier ausgewählten Inhibitoren zu einer Hemmung der Zellproliferation führten (Abb. 3.1). Einzig der B-Raf-Inhibitor Vemurafenib konnte trotz einer Steigerung der Dosis auf bis zu 10 μ M keinen Effekt auf die Proliferation von LTC-7-Zellen zeigen. Der Kinaseinhibitor Perifosin führte hingegen ab einer Konzentration von 3 μ M tendenziell zu einer Hemmung des Zellwachstums. Bei Steigerung der Dosis auf 20 μ M wurde dieser Effekt signifikant. Der BrdU-Einbau der Zellen wurde dabei auf etwa die Hälfte gesenkt. Der ebenfalls im mikromolaren Bereich wirksame Multikinaseinhibitor Regorafenib führte zu einer deutlichen Hemmung des BrdU-Einbaus, die bereits ab einer Konzentration von 1 μ M signifikant ausgeprägt war. Durch Verzehnfachung der Dosis konnte der proliferationshemmende Effekt etwa verdreifacht werden. Betrachtet man die Wirkung von Trametinib auf die immortalisierten Sternzellen, so fällt auf, dass der MEK-Inhibitor als einziger der vier Substanzen seinen Effekt im nanomolaren Bereich entfalten konnte. Bereits ab einer Konzentration von 1 nM kam es zu einem signifikant verminderten Einbau von BrdU in die DNA der Zellen.

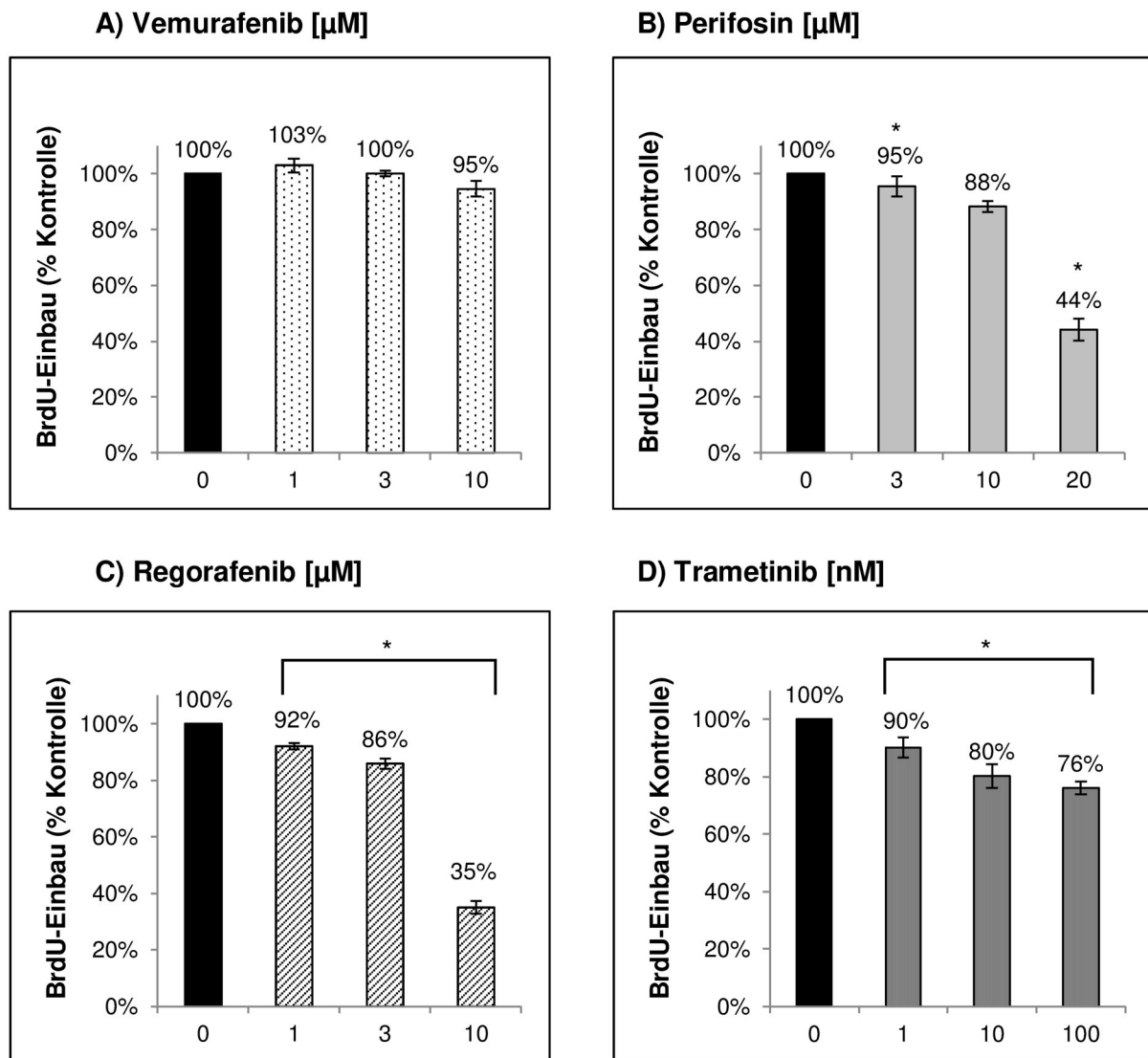


Abb. 3.1: Einfluss der Kinaseinhibitoren auf die Zellproliferation von LTC-7-Zellen

Immortalisierte Sternzellen wurden für 48 h mit den gezeigten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Für 24 h wurde BrdU mit einer Endkonzentration von 10 µmol/l eingesetzt. 100 % entspricht dem BrdU-Einbau unbehandelter Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) aus 12 voneinander unabhängigen Replikaten. Für die Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, * Bonferroni-korrigiertes $p < 0,0042$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

3.1.2 Zytotoxischer Effekt der Inhibitoren

Ein verminderter BrdU-Einbau in die DNA von Zellen kann zum einen durch eine Wachstumshemmung, zum anderen aber auch durch Zelltod infolge von Zytotoxizität bedingt sein. Um eine Aussage über die zellschädigenden Eigenschaften der Kinaseinhibitoren treffen zu können, wurde der *CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay* angewendet. Tote Zellen setzen Proteasen frei, die durch ein Lumineszenzverfahren quantifiziert werden können. Nach der 48-stündigen Versuchszeit waren in der unbehandelten Kontrolle 3 % der Zellen abgestorben (Abb. 3.2). Im Vergleich dazu ergab sich bei dem, als Positivkontrolle

dienenden, proapoptotischen Staurosporin ein Anteil toter Zellen von 61 %. Die zytotoxischen Effekte der SMI bewegten sich dazwischen. Eine steigende Inhibitor-dosis führte dabei immer zu vermehrter zellschädigender Wirkung. Statistisch signifikant war der zytotoxische Effekt bei den jeweils höchsten Konzentrationen von Vemurafenib und Trametinib. Am stärksten war die Zytotoxizität bei 20 μM Perifosin, mit einem Anteil von 13 % toter Zellen, ausgeprägt. Alle Werte der Inhibitoren blieben aber weit unter der zellschädigenden Wirkung des Staurosporins.

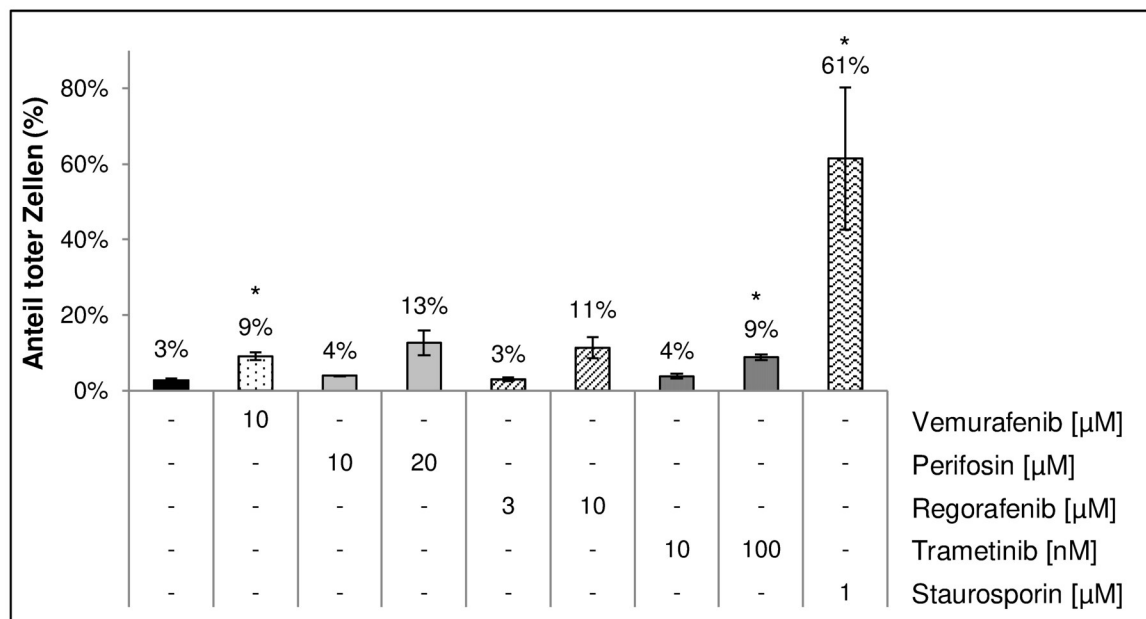


Abb. 3.2: Zytotoxischer Effekt der Inhibitoren auf LTC-7-Zellen

LTC-7-Zellen wurden für 48 h mit den gezeigten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Als Positivkontrolle diente das proapoptotische Staurosporin. Gemessen wurde die Lumineszenz toter Zellen, die in Relation zur gemessenen Lumineszenz der Gesamtzellzahl gesetzt wurde. Für die Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-U-Test zusammen mit der Bonferroni-Korrektur angewendet. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,0063$ [*]. Die Anzahl der untersuchten Proben betrug sechs. Aufgetragen sind die Mittelwerte (\pm SEM).

3.1.3 Wirkungen der SMI auf Signaltransduktionsebene

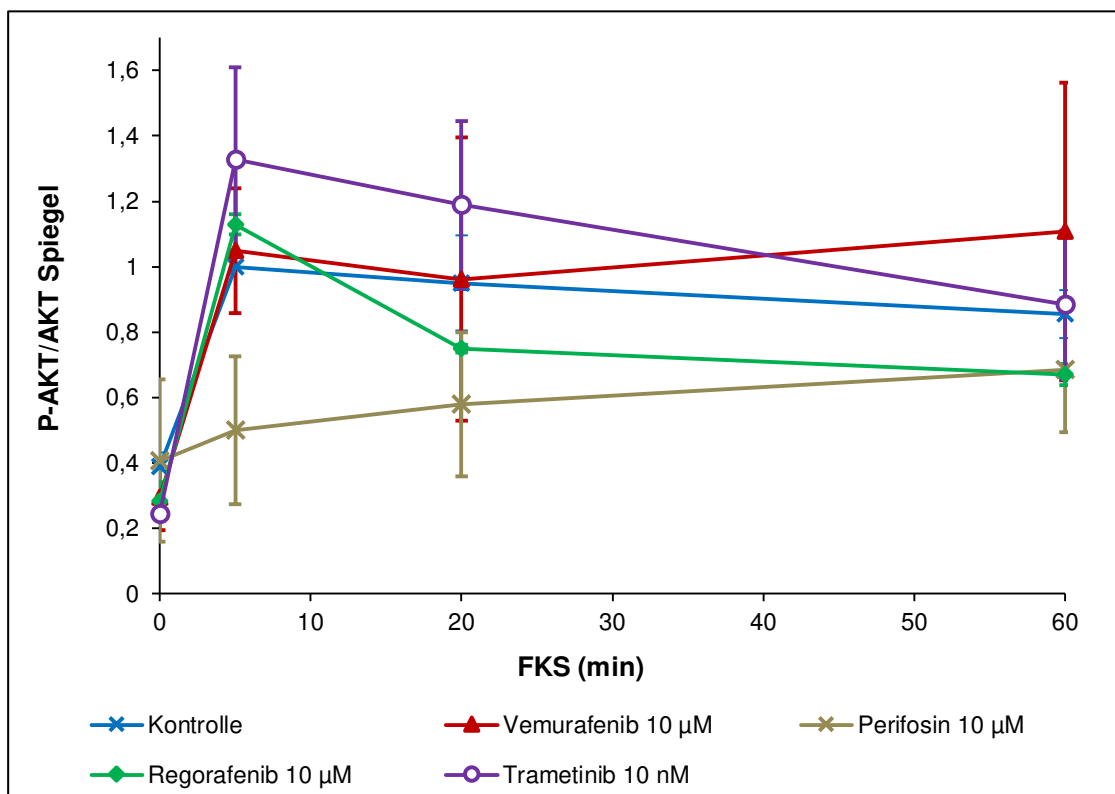
Bereits in früheren Studien wurde die Bedeutung des PI3-K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges für die Aktivierung von PSZ beschrieben (Jaster *et al.*, 2002; Masamune *et al.*, 2003a; McCarroll *et al.*, 2004). Daher wurden in Western-Blot-Analysen diese Signalwege untersucht, indem die Expression und Phosphorylierung von AKT bzw. ERK 1/2 quantifiziert wurden.

Dazu wurden LTC-7-Zellen mit serumfreiem Medium über 15 h inkubiert, sobald Subkonfluenz im Well erreicht war. Ziel des FKS-Entzugs war es, die durch Serum-Wachstumsfaktoren unterhaltene Phosphorylierung von Proteinen der Signaltransduktionsebene synchron in allen Zellen stark herabzusetzen. Am Folgetag wurde

der jeweilige, im serumfreien Medium verdünnte, Inhibitor für zwei Stunden hinzugegeben. In der zweiten Stunde der Inkubation erfolgte die Restimulation der Zellen mit FKS für jeweils festgesetzte Zeiträume. Durch diese Restimulation war es möglich, einen zeitlich definierten Impuls zu setzen, um Inhibitoreffekte unter standardisierten Bedingungen zu erfassen. Wie bei allen Versuchen wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Ohne FKS-Restimulation war lediglich eine schwache basale Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine vorhanden. Durch Hinzugabe von FKS konnte dieses Niveau deutlich gesteigert werden und erreichte bei fünfminütiger Stimulationsdauer seinen Höchstwert. Danach war ein leichter Abfall zu verzeichnen.

Abb. 3.3 enthält die quantitative Auswertung der Western-Blot-Daten. Beispiele für Einzelblots sind anhand von Primärzellen später in Abb. 3.7 gezeigt.

A) Aktivierungsgrad des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges



B) Aktivierungsgrad des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges

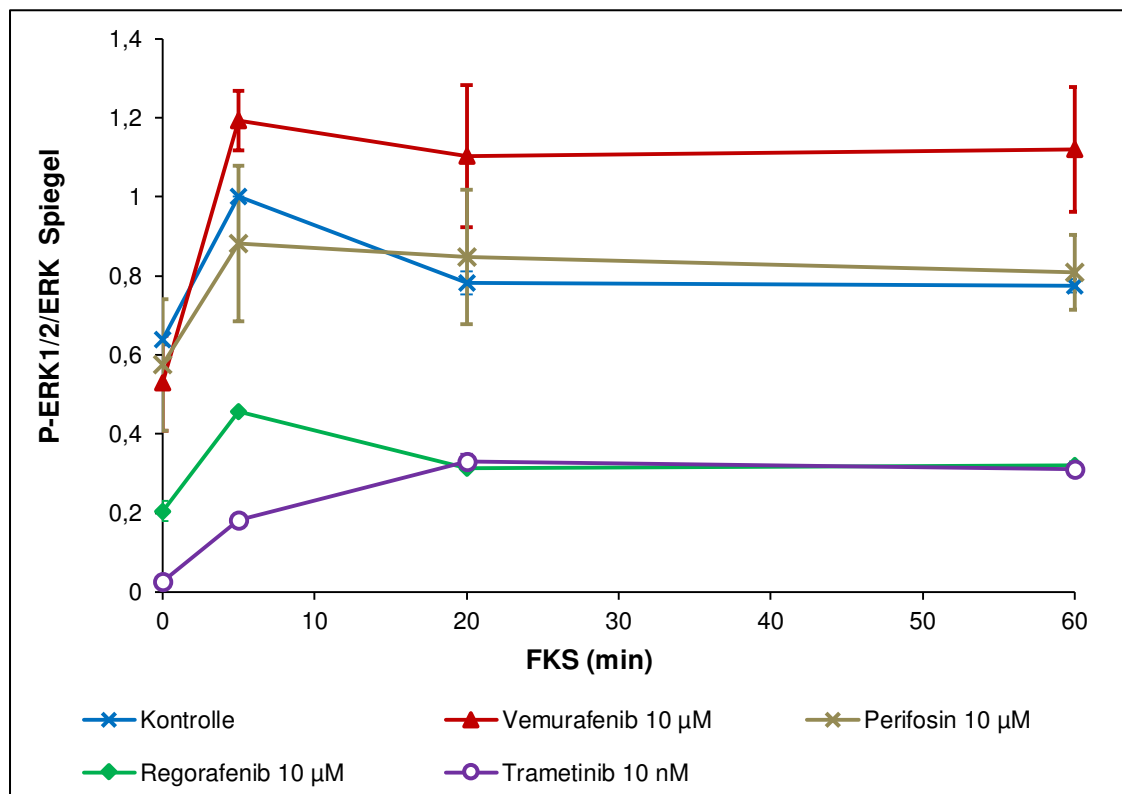


Abb. 3.3: Einfluss der Inhibitoren auf die Signaltransduktion in LTC-7-Zellen

Immortalisierte Sternzellen wurden durch 15-stündigen Serumentzug des Mediums auf den Versuch vorbereitet. Die aufgeführten SMI verblieben für 2 h auf den Zellen, die Dauer der Restimulation mit FKS (auf 10 %) ist der Abszisse zu entnehmen. Die Proben wurden mittels Western-Blot Analyse untersucht. Hierzu wurden die Signalintensitäten des phosphorylierten und des Gesamtproteins mit der *Odyssey Software 3.0* ermittelt. Die Quantifizierung von GAPDH (hier nicht gezeigt) diente zum Ausschluss von Ladungsungleichgewichten. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) der Ratios aus phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein von zwei bis drei biologischen Replikaten. Aufgrund der geringen Wertezahl wurde kein statistischer Test durchgeführt.

Betrachtet man die Effekte der Inhibitoren auf den PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg, so fällt auf, dass Perifosin tendenziell zu einer Hemmung dieses Signalweges führte (Abb. 3.3 A). Dieser Effekt war insbesondere bei einer FKS-Restimulationsdauer von 5 und 20 min sichtbar. Mit länger werdender FKS-Einwirkung glich sich der Aktivierungsgrad des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges in den mit Perifosin behandelten Zellen denen der Kontrolle an. Alle anderen SMI veränderten die Ratio aus phosphoryliertem AKT und Gesamtprotein nicht wesentlich. Hingegen wurde die Expression von Proteinen des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges von drei Kinaseinhibitoren beeinflusst (Abb. 3.3 B). Sowohl Regorafenib, als auch Trametinib hemmten gleichstark die Phosphorylierung von ERK 1 und 2. Das Aktivierungsniveau wurde konstant über den gesamten Versuchszeitraum durch beide Inhibitoren auf etwa ein Drittel gesenkt. Unter dem Einfluss von Vemurafenib kam es hingegen tendenziell zu einer Verstärkung der ERK-Phosphorylierung.

3.1.4 Konsequenzen der Ergebnisse der LTC-7-Zellen für die Versuche mit primären PSZ

Fasst man die Erkenntnisse der Versuche an immortalisierten Sternzellen zusammen, so konnten nur zwei der vier Inhibitoren, Regorafenib und Trametinib, überzeugen: Vemurafenib zeigte selbst bei hoher Dosis keinen hemmenden Effekt auf die Zellproliferation. Auch kam es zu keiner Adressierung eines für PSZ wichtigen Signalweges. Deshalb wurde Vemurafenib auch nicht in die Versuchsreihe mit primären PSZ übernommen. Auf der anderen Seite hemmte der Multikinaseinhibitor Regorafenib effektiv das Wachstum der Zellen und unterdrückte die Phosphorylierung des ERK 1/2-Proteins des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges. Gleiches gilt für den MEK-Inhibitor Trametinib. Auch unter dem Einfluss von Perifosin kam es zu einer Unterdrückung der Zellproliferation bei einer Verminderung des phosphorylierten AKT-Proteins. Ein deutlicher Rückgang des BrdU-Einbaus zeigte sich aber erst bei einer vergleichsweise hohen Konzentration von 20 μ M. Gleichzeitig wurde ein neuer vielversprechender PI3-Kinaseinhibitor mit zusätzlicher mTOR-Wirkung, das Dactolisib, verfügbar, sodass im Folgenden Perifosin durch Dactolisib ersetzt wurde.

3.2 Ergebnisse der primären PSZ

3.2.1 SMI-Effekte auf die Zellproliferation

Zunächst wurden auch hier die Effekte der drei verbliebenen Kinaseinhibitoren auf das Zellwachstum mittels BrdU-Analyse untersucht (Abb. 3.4). Nur bei zwei der drei SMI konnte eine antiproliferative Wirkung nachgewiesen werden. Unerwartet war, dass Regorafenib im Gegensatz zu seiner Wirkung bei LTC-7-Zellen konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Steigerung des Zellwachstums führte. Bei einer Dosis von 10 μM wurde der BrdU-Einbau der Zellen um etwa 40 % erhöht. Auf der anderen Seite behielt Trametinib seine antiproliferative Wirkung auch bei den Primärzellen bei und wirkte hier sogar stärker, als es bei den immortalisierten Zellen der Fall war. Eine signifikante Hemmwirkung war ab einer Konzentration von 1 nM nachzuweisen. Eine Dosis von 100 nM reduzierte das Zellwachstum auf 22 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der neu hinzugenommene Inhibitor Dactolisib zeichnete sich ebenfalls durch eine konzentrationsabhängige Wirkung im nanomolaren Bereich aus, die ab einer Dosierung von 10 nM signifikante Effekte zeigte. Wie auch schon beim Trametinib konnte hier die stärkste Wachstumshemmung bei einer Konzentration von 100 nM detektiert werden.

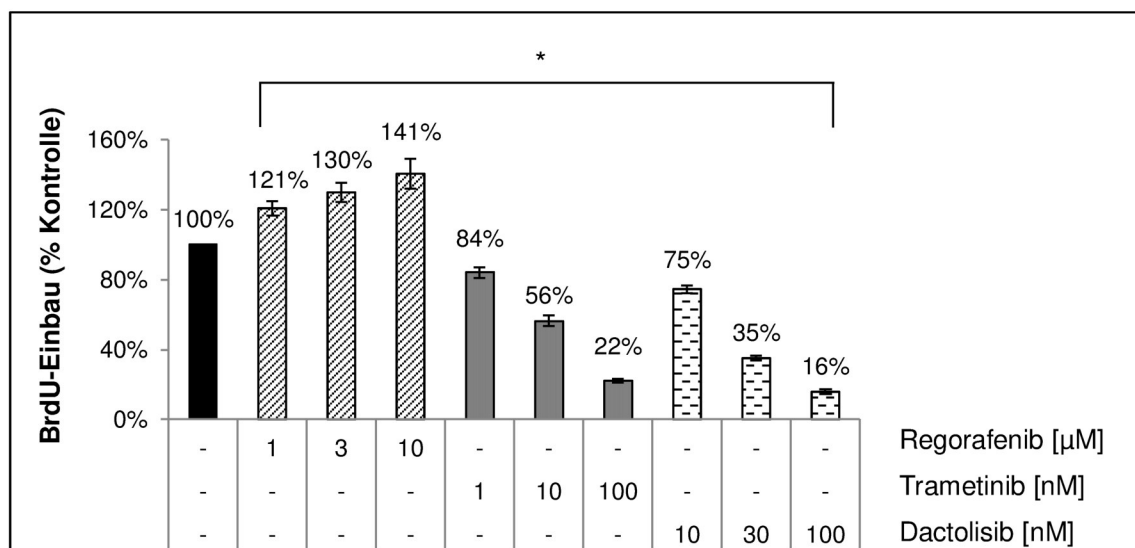


Abb. 3.4: Hemmung der Zellproliferation von PSZ durch Regorafenib, Trametinib und Dactolisib

Primäre PSZ wurden für 48 h mit den angegebenen Inhibitoren behandelt. Für 24 h wurde BrdU in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ hinzugegeben. Die Analyse erfolgte mittels BrdU-ELISA. Abgebildet sind die Mittelwerte (\pm SEM) aus 18 untersuchten Proben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt, nach Bonferroni-Korrektur betrug das Signifikanzniveau $p < 0,0056$ [*].

3.2.2 Synergistische Effekte von Trametinib und Dactolisib auf das Zellwachstum

Die Kombination zweier Medikamente hat zum Ziel, die jeweilige Einzeldosis und die damit verbundenen potenziell schädigenden Wirkungen zu senken, ohne an gewünschter Wirkung zu verlieren. Ob eine Kombination aus Trametinib und Dactolisib zu einer Verstärkung der hemmenden Effekte auf die Zellproliferation führt, war die Fragestellung eines weiteren BrdU-Einbautests. Dazu wurden niedrige Einzeldosen beider SMI in jeweils zwei Dosierungen zu vier Kombinationen eingesetzt. Die folgende Grafik verdeutlicht (Abb. 3.5), dass Trametinib und Dactolisib zusammen in allen Kombinationen über eine synergistisch hemmende Wirkung auf die Zellproliferation verfügten. Bereits die Kombination aus 1 nM Trametinib und 10 nM Dactolisib senkte den BrdU-Einbau der Primärzellen signifikant, sowohl in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle, als auch gegenüber der Wirkung der jeweiligen Einzelsubstanzen. Je höher die beiden Kinaseinhibitoren dosiert waren, desto deutlicher fiel der antiproliferative Effekt auf die PSZ aus.

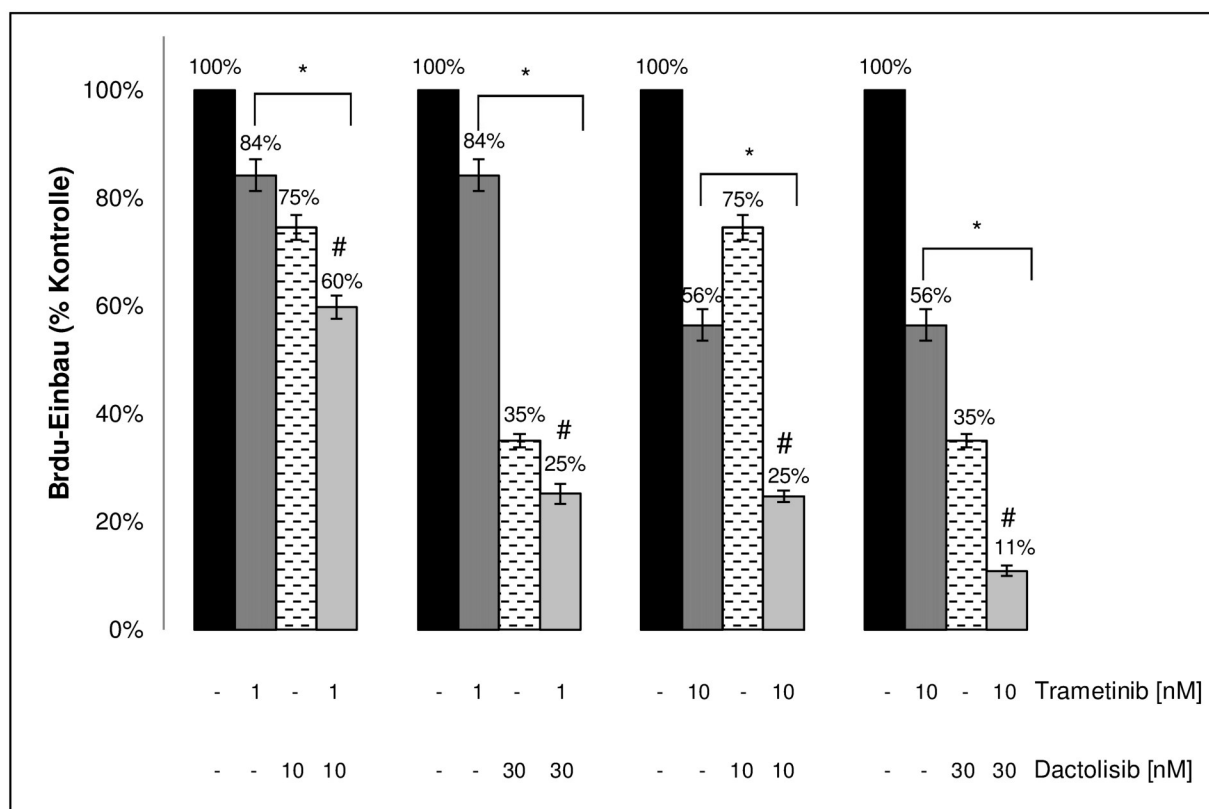


Abb. 3.5: Synergistische Wirkung von Trametinib und Dactolisib auf den BrdU-Einbau in PSZ

Die Primärzellen wurden mit den angegebenen Substanzen jeweils einzeln bzw. in Kombination über 48 h inkubiert. Daten von neun unabhängigen Replikaten wurden in die Berechnung der Mittelwerte und des SEM einbezogen. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurden Signifikanzen der Werte bezüglich der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,0025$ [*]) bzw. der jeweiligen Einzelsubstanzen ($p < 0,0025$ [#]) erhoben. Es wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

3.2.3 Zytotoxische Wirkung der Kinaseinhibitoren

Dieser Versuch diente dazu, eventuell zellschädigende Effekte der SMI auf primäre PSZ detektieren zu können. Wie schon bei den immortalisierten Zellen wurde dies mittels eines *CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay* analysiert. Es zeigte sich eine Rate von 10 % toter Zellen in der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.6). Unter Einwirkung der Kinaseinhibitoren stieg dieser Anteil leicht an, wobei sich keine Signifikanzen feststellen ließen. Mit 21 % lag die Rate toter Zellen bei Dactolisib in den Konzentrationen von 10 und 100 nM am höchsten. Betrachtet man die Ergebnisse der Kombinationen aus jeweils zwei Konzentrationen von Dactolisib und Trametinib, so fällt auf, dass die zytotoxische Wirkung im Vergleich zu den Einzelsubstanzen nicht anstieg, sondern auf einem konstanten Niveau blieb. Einzig das als Positivkontrolle dienende Staurosporin führte zu einem signifikanten Anstieg des Anteils toter Zellen.

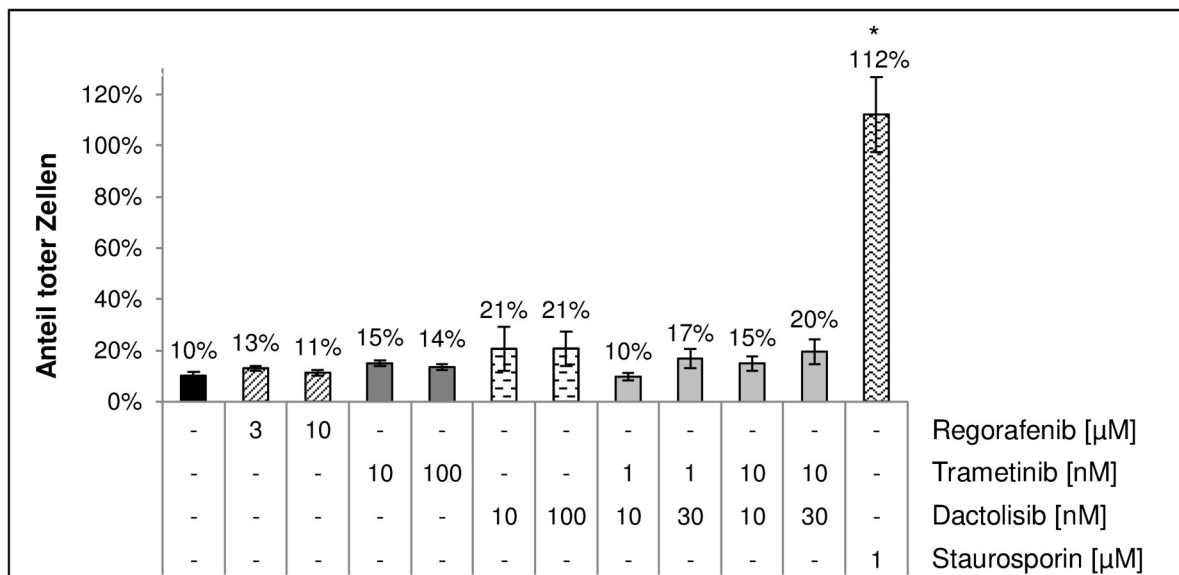


Abb. 3.6: Zytotoxische Effekte der Inhibitoren auf PSZ

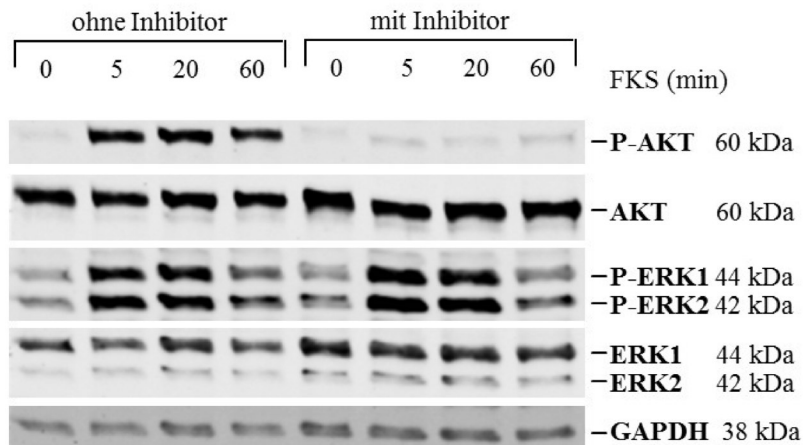
Primäre PSZ wurden für 48 h mit den angegebenen Substanzen in mehreren Konzentrationen behandelt. Um den Anteil toter Zellen zu berechnen, wurde der Quotient aus der gemessenen Lumineszenz der toten Zellen sowie der Gesamtheit der Zellen gebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) aus sechs voneinander unabhängigen Proben. Als statistisch signifikant wurden Werte von $p < 0,0026$ [*] im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Mann-Whitney-U-Test und nach Bonferroni-Korrektur angenommen.

3.2.4 Auswirkungen der SMI auf die Signaltransduktion

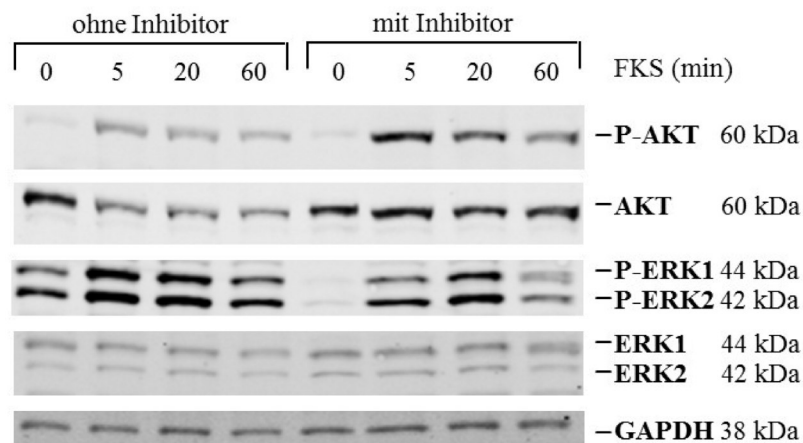
Wie schon bei den LTC-7-Zellen erfolgte bei den Primärzellen die Untersuchung der für die Sternzellaktivierung wichtigen PI3-K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwege. Dazu wurden subkonfluent gewachsene PSZ über 15 h mit serumfreiem Medium inkubiert, bevor die Zugabe der jeweiligen Inhibitoren, in serumfreiem Medium verdünnt, erfolgte. In der zweiten Stunde der Inkubation wurden die Zellen über definierte Zeiträume mit FKS restimuliert. Mittels Western-Blot-Analyse wurde durch die Bildung des Quotienten aus phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein der Aktivierungsgrad des Signalweges ermittelt. In Abb. 3.7 sind die Ergebnisse dieses Versuchs dargestellt. Soweit nicht anders vermerkt, ist bei allen Grafiken zur Auswertung der Western-Blot-Daten zunächst ein beispielhafter Blot in Teilabbildung A gezeigt. Teilabbildung B bzw. C dienen der quantitativen Betrachtung des PI3-K/AKT/mTOR- bzw. Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges. Wie auch bei den anderen Versuchen wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Sie zeichneten sich durch einen sehr niedrigen Phosphoproteinspiegel aus, wenn sie nicht mit FKS restimuliert worden waren. Ab einer Restimulationsdauer von 5 min konnte eine Induktion der Phosphorylierung des AKT- und ERK-Proteins nachvollzogen werden. Dieses Aktivierungsniveau des phosphorylierten AKT-Proteins blieb über die gesamte Versuchsdauer konstant. Beim Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg ist die maximale Restimulation bei 5 min FKS-Einwirkung zu verzeichnen. Danach findet ein Abfall der P-ERK1/2-Spiegel statt. Daher ist für beide Signalwege das Proteinverhältnis aus phosphoryliertem und Gesamtprotein bei 5 min FKS-Restimulationszeit, als Bezugspunkt für die mit Inhibitor versehen Proben, ausgewählt worden.

A) Western-Blot-Bilder

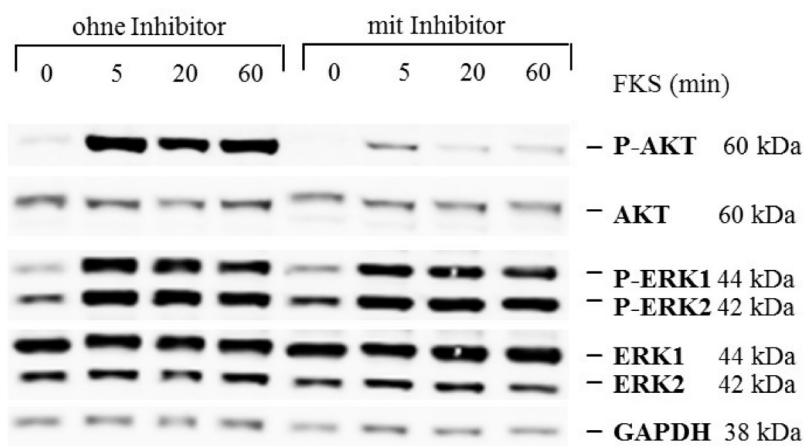
I. Regorafenib (10 μ M)



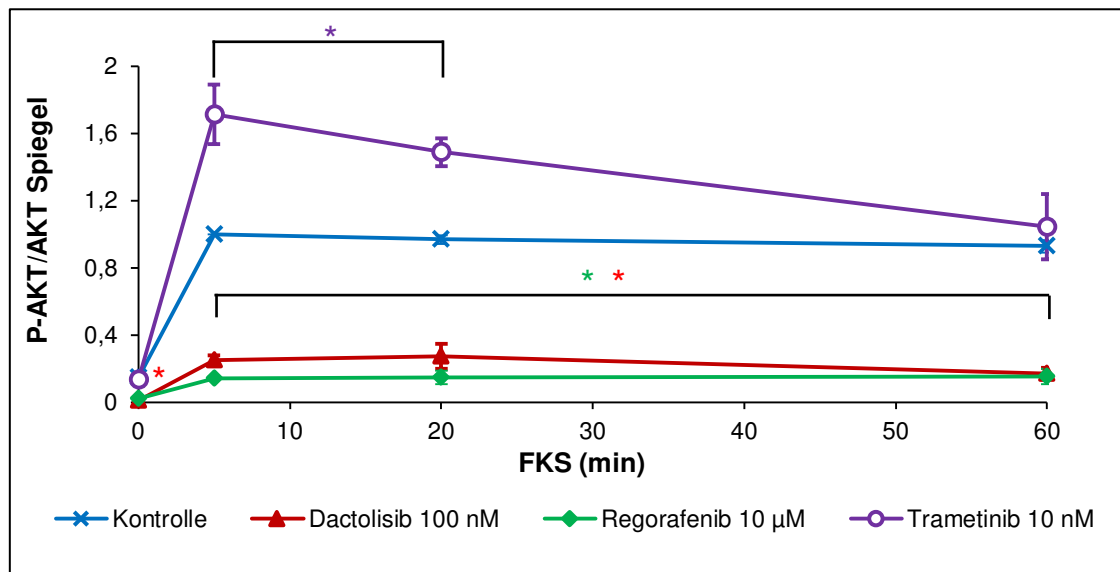
II. Trametinib (10 nM)



III. Dactolisib (100 nM)



B) Hemmung des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges durch Regorafenib und Dactolisib



C) Verminderung des P-ERK1/2 Spiegels durch Trametinib

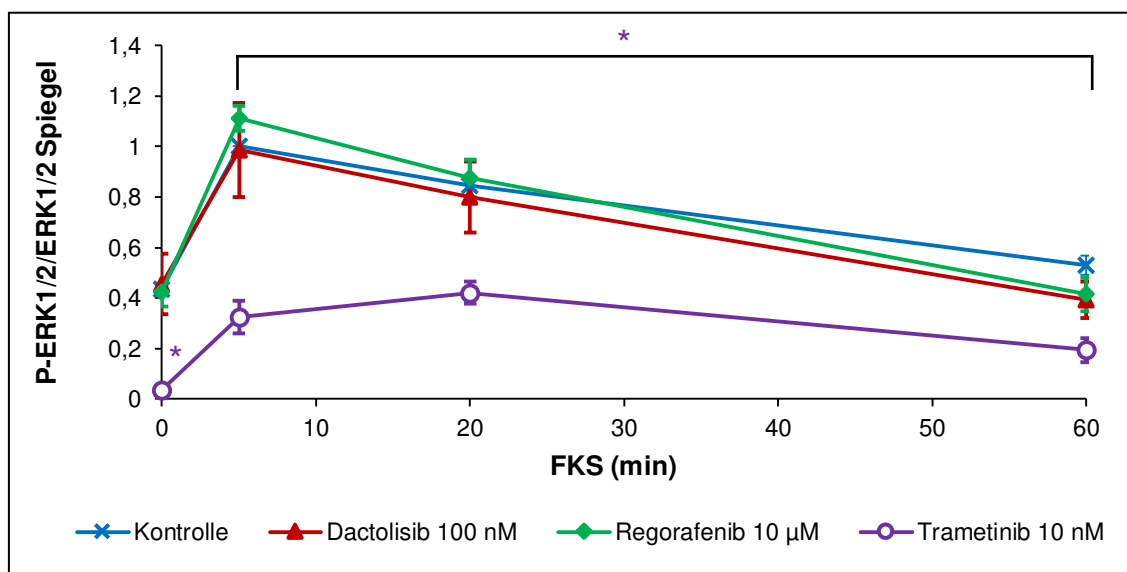


Abb. 3.7: Einfluss der SMI auf den PI3-K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg in PSZ

Für diesen Versuch wurde dem Zellmedium 15 h vor Zugabe der Inhibitoren das Serum entzogen. Die Zellen wurden mit den SMI für zwei Stunden ohne Serum im Medium inkubiert, in der zweiten Stunde fand die Restimulation der PSZ mit FKS (Endkonzentration: 17 %) statt. Die Dauer der Restimulation ist dem Kopf der Western-Blot-Bilder in der Abb. A bzw. der Abszisse in den Abb. B und C zu entnehmen. Für die Auswertung wurden mittels *Odyssey Software 3.0* zunächst die Signalintensität des phosphorylierten Proteins und später des Gesamtproteins quantifiziert und daraus ein Quotient gebildet. Dieser ist in Abb. B für den PI3-K/AKT/mTOR- und in Abb. C für den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg dargestellt. Das *housekeeping*-Protein GAPDH diente der Ladungskontrolle. Abb. A zeigt typische Western-Blot Bilder der jeweiligen Inhibitoren. In die Signifikanzanalyse gingen Werte von fünf Einzelversuchen ein. Sie erfolgte unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests. Von statistischer Signifikanz wurde ab einem P-Wert von $p < 0,0167$ [*] nach Bonferroni-Korrektur ausgegangen. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SEM).

Auch unter der Einwirkung von SMI waren die Basalwerte der Proteinphosphorylierung zum Zeitpunkt 0 min sehr gering. Anders als bei den immortalisierten Zellen, war bei Regorafenib eine signifikant starke Hemmung des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges und nicht des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges zu beobachten. Das Verhältnis von phosphoryliertem AKT zum AKT-Gesamtprotein ließ sich auch durch eine FKS-Restimulationsdauer von 60 min nur minimal steigern.

Auch Dactolisib reduzierte klar die Phosphorylierung des AKT-Proteins über den gesamten Versuchszeitraum. Das Hinzugeben von FKS bewirkte eine sehr geringe Steigerung des P-AKT-Spiegels, wobei eine längere Restimulationszeit nicht zu einer Erhöhung des Phosphoproteinanteils beitrug. Dactolisib, wie auch Regorafenib, führten nicht zu einer Beeinflussung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges. Simultan zur Kontrolle kam es bei beiden Inhibitoren zu einem Anstieg der P-ERK1/2/ERK1/2 Spiegel nach fünfminütiger FKS-Restimulation. Je länger die FKS-Wirkung anhielt, desto mehr näherten sich die Proteinspiegel ihrem Verhältnis ohne FKS-Restimulation an.

Im Vergleich dazu kam es unter der Einwirkung von Trametinib zu einer deutlichen Hemmung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges sowohl ohne FKS-Restimulation als auch über den gesamten Zeitraum der FKS-Einwirkung. Die höchste Aktivierung des P-ERK1/2 Proteins war bei 20 min FKS-Restimulationsdauer zu verzeichnen. Dennoch war dieser Wert gegenüber der Kontrolle um etwa die Hälfte reduziert. Im Gegensatz dazu war durch den Einsatz von Trametinib auch ein leichter Anstieg im Aktivierungsgrad des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges zu beobachten. So lag der Anteil von phosphoryliertem AKT bei 5 und 20 min FKS-Restimulationsdauer signifikant über den dazugehörigen Kontrollwerten.

Somit riefen alle Kinaseinhibitoren eine Veränderung des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges hervor, aber nur unter Trametinib kam es zu einem Eingriff in die Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges.

3.2.5 Dosisabhängige Wirkung von Dactolisib auf Signaltransduktionsebene

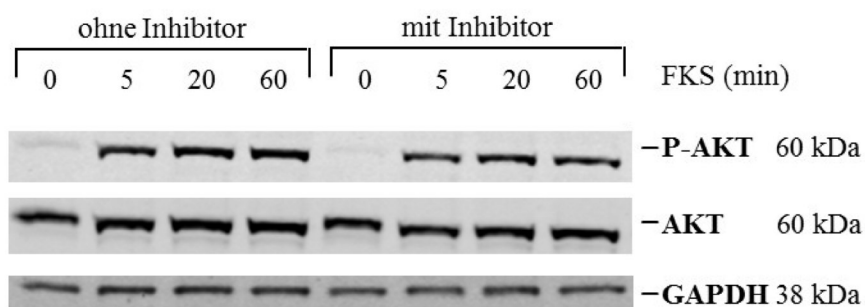
Die Hemmung der Zellproliferation ist abhängig von der eingesetzten Konzentration des Inhibitors. Ob die steigende Dosis einer Substanz zu einer verstärkten Hemmung des adressierten Signalweges führen kann, wurde im Folgenden exemplarisch für die Wirkung von Dactolisib auf den PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg untersucht (Abb. 3.8). Primäre PSZ wurden unter serumfreien Bedingungen mit Dactolisib in den Dosierungen 10, 30 und 100 nM inkubiert, für definierte Zeiten mit FKS restimuliert und die Proben danach mittels Western-Blot-Verfahren analysiert. Übersichtshalber sind hier nur die Ergebnisse der Wirkung von Dactolisib auf die Phosphorylierung des AKT-Proteins dargestellt. Keine der

gewählten Konzentrationen hat zu einer Veränderung des Aktivierungsgrades des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges geführt.

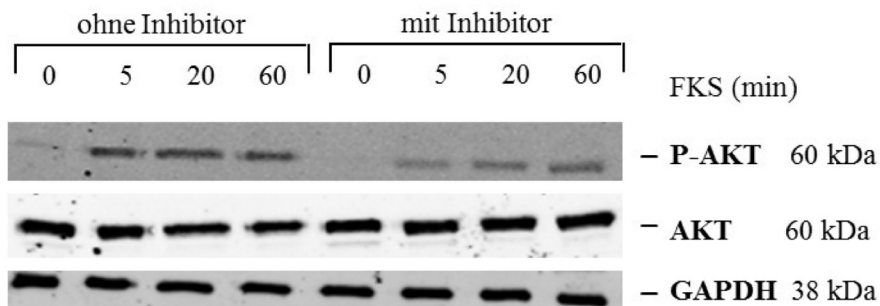
Ohne FKS-Stimulation war nur ein sehr geringes Maß an AKT-Phosphorylierung vorhanden. Durch Hinzugabe von FKS war besonders bei der Kontrolle eine stark ausgeprägte Steigerung des Aktivierungsniveaus zu konstatieren.

A) Western-Blot-Bilder

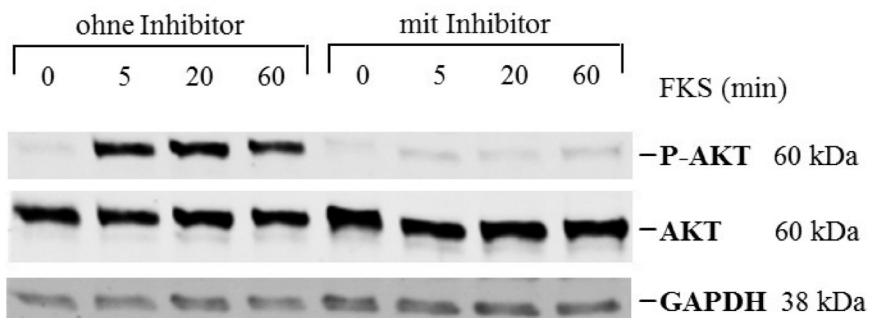
I. Dactolisib (10 nM)



II. Dactolisib (30 nM)



III. Dactolisib (100 nM)



B) Dosisabhängige Hemmung des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges

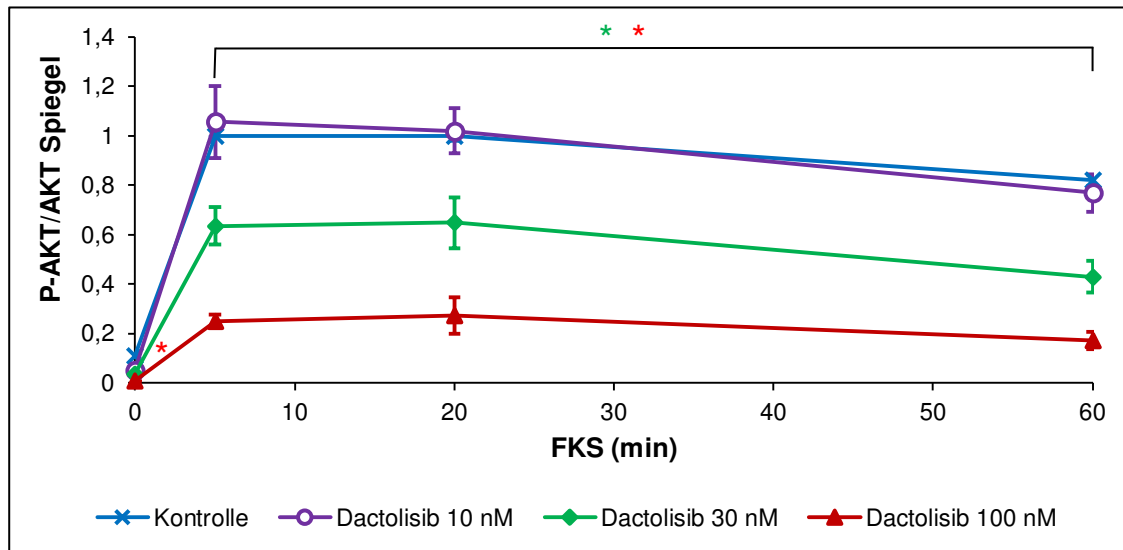


Abb. 3.8: Dosisabhängige Wirkung von Dactolisib auf den PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg

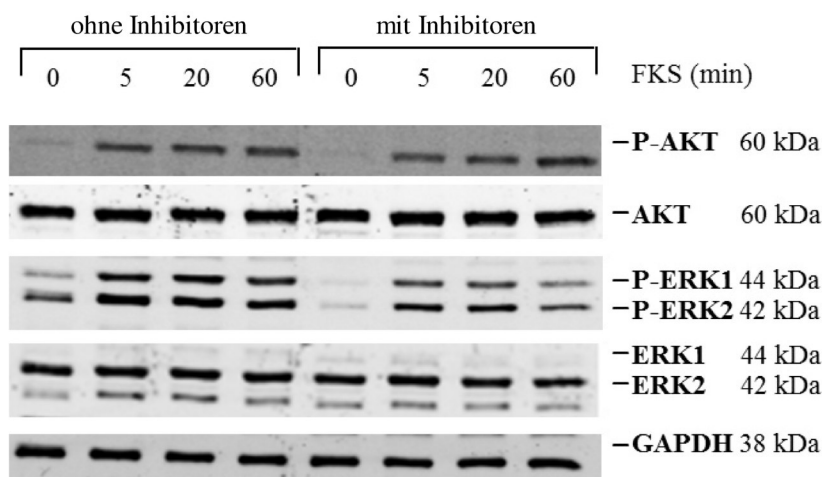
Primäre PSZ wurden durch Serumentzug des Kulturmediums auf diesen Versuch vorbereitet. Dactolisib wirkte danach für zwei Stunden in drei Konzentrationen auf die Zellen ein. Zu definierten Zeitpunkten erfolgte in der zweiten Stunde der Inhibitorinkubation die Zugabe von FKS (Endkonzentration: 17%). Die Dauer der Restimulation ist der Abszisse zu entnehmen. Fünf voneinander unabhängige Proben wurden mittels Western-Blot-Analyse aufgearbeitet. Ein entsprechender Beispielblot ist in Teilabbildung A zu sehen. Unter Verwendung der *Odyssey Software 3.0* wurde zunächst die Signalintensität des phosphorylierten Proteins und in einem folgenden Schritt die des Gesamtproteins ermittelt und daraus ein Quotient gebildet (Teilabbildung B). Um Ladungsunterschiede auszuschließen, erfolgte die Detektion des GAPDH-Proteins. Signifikanzen von $p < 0,0167$ [*] wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test mit nachfolgender Bonferroni-Korrektur bestimmt. Daten aus fünf Versuchen wurden in die Berechnung von Mittelwert und SEM einbezogen.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle übte eine Konzentration von 10 nM Dactolisib keine Wirkung auf den PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg aus. Bei einer Dosis von 30 nM Dactolisib kam es jedoch zu einer signifikanten Hemmung der AKT-Phosphorylierung ab einer FKS-Restimulationsdauer von 5 min. Am stärksten fiel die Wirkung bei einer Konzentration von 100 nM Dactolisib aus. Hier war der Effekt der Inhibition des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges über die gesamte Zeitspanne signifikant, da die Phosphorylierung von AKT auf einem geringen Niveau verblieb. Die gewählte Dosis korreliert demnach mit dem Ausmaß der AKT-Hemmung.

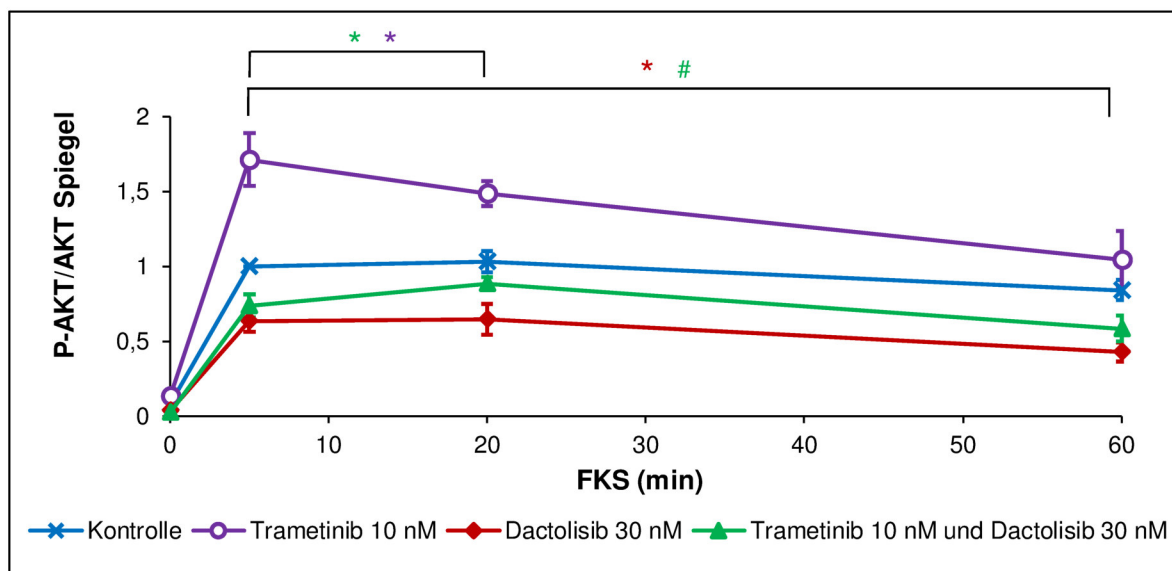
3.2.6 Einfluss der Kombination aus Trametinib und Dactolisib auf die Signaltransduktion

Inwieweit sich Trametinib und Dactolisib auch in ihrer Wirkung auf Signaltransduktionsebene ergänzen, sollte in diesem Versuch überprüft werden (Abb. 3.9). Dazu wurde die am stärksten wirksame Kombination beider Inhibitoren aus der Zellproliferationsanalyse ausgewählt (Trametinib 10 nM und Dactolisib 30 nM). In den vorausgegangenen Einzelversuchen wurde deutlich, dass Trametinib zu einer Hemmung des Ras/Raf/MEK/ERK- und Dactolisib zu einer Herunterregulation des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges führten. Die Fragestellung war nun, ob eine Kombination der SMI Einfluss auf beide Signalwege ausübt. Das Versuchsdesign blieb dabei unverändert.

A) Western-Blot-Bilder der Kombination aus Trametinib 10 nM und Dactolisib 30 nM



B) Wirkung der Inhibitorkombination auf den PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg



C) Beeinflussung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges durch Dactolisib und Trametinib

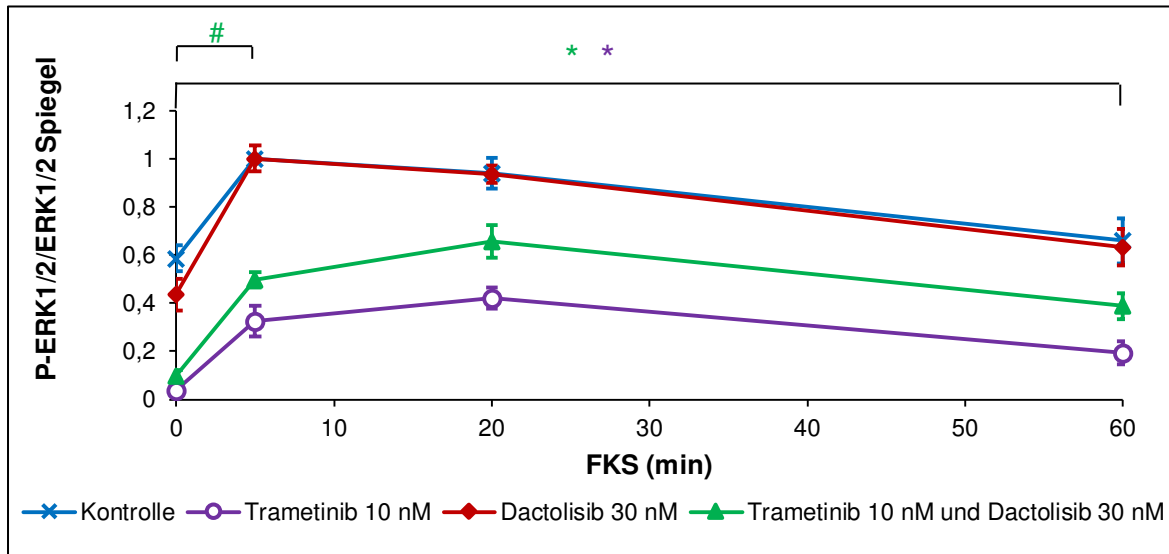


Abb. 3.9: Wirkung der Kombination aus Dactolisib und Trametinib auf Ebene des PI3-K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges

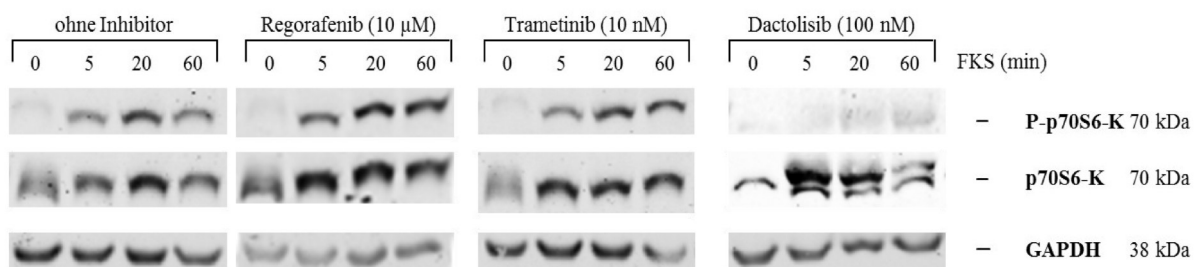
Nach 15-stündiger Vorbehandlung mit serumfreiem Kulturmedium wurden primäre PSZ mit den jeweiligen Inhibitoren einzeln oder in Kombination für zwei Stunden inkubiert. In der zweiten Stunde erfolgte die Restimulation mit FKS (Endkonzentration 17 %; Zeitangaben auf der Abszisse). Die Proben wurden mittels Western-Blot-Verfahren ausgewertet. Abb. A zeigt typische Western-Blot-Bilder eines Einzelversuches. Mit der *Odyssey Software 3.0* wurden die Signalintensitäten des phosphorylierten und des Gesamtproteins bestimmt und damit ein Quotient berechnet. In Abb. B ist dieser Quotient für den PI3-K/AKT/mTOR- und in Abb. C für den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg dargestellt. Die Analyse von GAPDH diente der Überprüfung der Proteinbeladung. In die Berechnung der Mittelwerte (\pm SEM) gingen Einzelwerte aus fünf voneinander unabhängigen Versuchen ein. Für die Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-U-Test mit nachfolgender Bonferroni-Korrektur verwendet. P-Werte mit $p < 0,0167$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle wurden mit einem Stern [*] gekennzeichnet. P-Werte mit derselben Irrtumswahrscheinlichkeit, die mit einer Raute [#] markiert sind, beziehen sich in Abb. B auf Signifikanzen bezüglich der Einzelwirkung von Trametinib 10 nM und in Abb. C gegenüber Dactolisib 30 nM.

Betrachtet man den PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg, so wird deutlich, dass die eingesetzte Kombination in der Zeitspanne zwischen 5 und 20 min FKS-Restimulation eine signifikante Hemmung der Phosphorylierung des AKT-Proteins gegenüber der unbehandelten Kontrolle herbeiführte. Gleichzeitig zeigte sich, dass die Verbindung aus Trametinib und Dactolisib im Gegensatz zur alleinigen Trametinibgabe den PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg signifikant hemmte. Dadurch kam der aktivierende Einfluss von Trametinib auf diesen Signalweg nicht mehr zum Tragen. Genauso wirksam zeigte sich die Kombination aus Trametinib und Dactolisib auch bei der Herabsetzung der Phosphorylierung der ERK-Proteine, welche signifikant über die gesamte Zeitspanne gegenüber der unbehandelten Kontrolle nachzuverfolgen war. Lediglich in den ersten 5 min kam es unter dem Einfluss der Kombination zu signifikant geringeren Hemmeffekten, als es unter der alleinigen Trametinibgabe der Fall war.

3.2.7 Analyse der Inhibitoreffekte auf die p70S6-Kinase

Die p70S6-Kinase (p70S6-K) befindet sich *downstream* im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg. In diesem Versuch wurde der Aktivierungsgrad dieses Proteins ebenfalls durch Nutzung des Western-Blot-Verfahrens analysiert (Abb. 3.10). Dabei wurde ein Antikörper eingesetzt, der selektiv die aktivierte, phosphorylierte Form des Enzyms detektierte. Erneut kam ein Versuchsprotokoll zur Anwendung, das eine Vorinkubation der PSZ mit den Inhibitoren unter serumfreien Kulturbedingungen, gefolgt von einer Restimulation mit FKS für definierte Zeiten, beinhaltete. Anders als bei den anderen Western-Blot-Versuchen, blieb hier der aktivierende Einfluss von FKS auf die Aktivierung des Proteins aus.

A) Western-Blot-Bilder



B) Quantifizierung der p70S6-K-Phosphorylierung

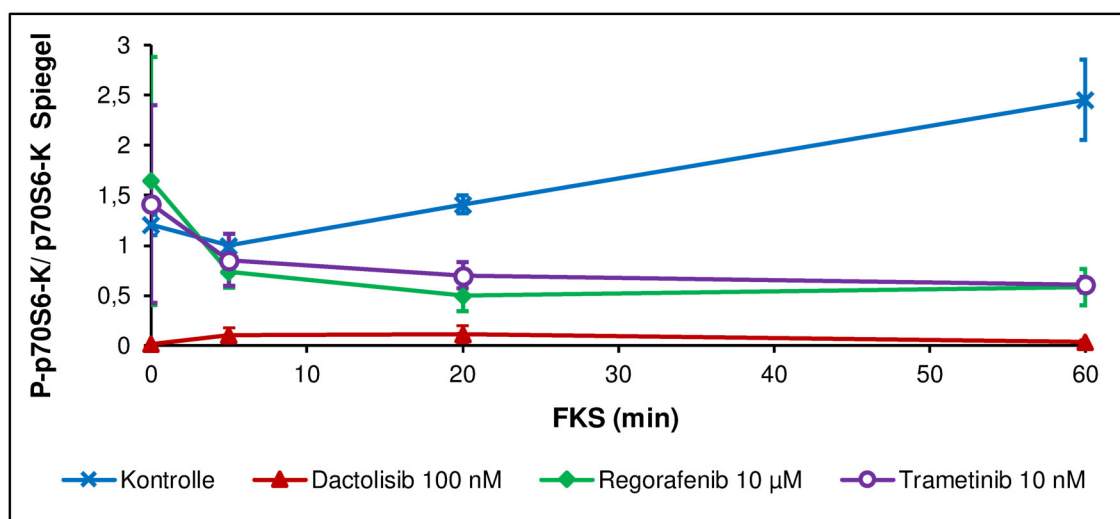


Abb. 3.10: Effekte der SMI auf die Phosphorylierung der p70S6-K in PSZ

Primäre PSZ wurden nach 15-stündigem Entzug des Serums im Kulturmedium mit den angegebenen Substanzen über zwei Stunden inkubiert. Die Zugabe von FKS (Endkonzentration: 17 %) erfolgte in der zweiten Stunde der Inkubation (siehe Abszisse). Für die Aufarbeitung der Proben wurde das Western-Blot-Verfahren angewendet. Abb. A zeigt typische Einzelbilder eines Western-Blot-Versuches. Mittels *Odyssey Software 3.0* wurden die Signalintensitäten der phosphorylierten p70S6-K und des korrespondierenden Gesamtproteins bestimmt und daraus ein Quotient gebildet (Abb. B). Die Intensitätsbestimmung von GAPDH diente der Detektion von Ladungsunterschieden. Aufgrund der geringen Wertezahl von $n=3$ wurde auf eine Signifikanzberechnung verzichtet. Aufgetragen sind die Mittelwerte (\pm SEM).

Aus der Beispielabbildung des Western-Blots geht hervor, dass sich das p70S6-K-Gesamtprotein als Doppelbande darstellte. Diese war bereits ohne Inhibitorzugabe sowie unter der Wirkung von Regorafenib und Trametinib andeutungsweise sichtbar. Klar erkennbar zeigten sich die Doppelbanden nach Gabe von Dactolisib. Die molekularen Hintergründe dieser Beobachtung wurden in der Arbeit nicht weiter untersucht. Ohne Inhibitoreinwirkung war zunächst ein konstantes Aktivierungsniveau der p70S6-K zu verzeichnen. Mit zunehmender Dauer der FKS-Restimulation kam es aber zu einem Anstieg des phosphorylierten Proteinanteils. Hingegen kam es unter der Einwirkung von Dactolisib zu einer starken Inhibition der Phosphorylierung der p70S6-K über den gesamten Restimulationszeitraum mit FKS. Die Kinaseinhibitoren Regorafenib und Trametinib zeigten ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die Aktivierung dieser Kinase, allerdings war diese Wirkung erst nach einer Restimulationsdauer von 20 min ersichtlich.

3.2.8 Einfluss der Kinaseinhibitoren auf den Aktivierungsmarker α -SMA

Als Maß für die Ausprägung des myofibroblastischen Phänotyps von PSZ kann die Expression des Proteins α -SMA dienen. Dafür wurden Primärzellen für 48 h mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt und die daraus resultierenden Proben mittels Western-Blot-Verfahren untersucht (Abb. 3.11). Dabei wurde ersichtlich, dass keiner der ausgewählten Kinaseinhibitoren zu einer Veränderung der α -SMA Expression führte.

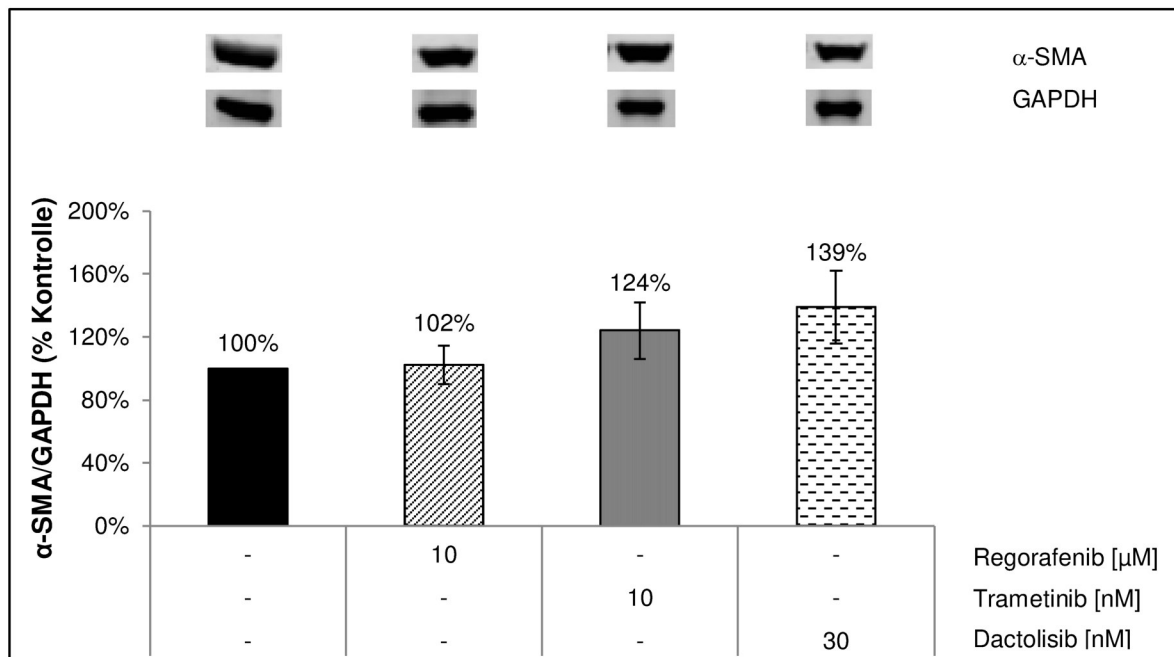


Abb. 3.11: Kinaseinhibitoren ohne Wirkung auf die α -SMA-Expression

Nach zweitägiger Inkubation von PSZ mit den ausgewählten SMI wurden die Proben mittels Western-Blot-Verfahren ausgewertet. Unter Verwendung der *Odyssey Software 3.0* wurden die Signalintensitäten von α -SMA und zum Proteinabgleich vom *housekeeping*-Protein GAPDH ermittelt und daraus ein Quotient gebildet. Mit dem Mann-Whitney-U-Test konnten keine Signifikanzen (Schwellenwert: $p < 0,05$) detektiert werden. Es wurden ≥ 6 Einzelversuche durchgeführt. In der Abbildung sichtbar sind die Mittelwerte (\pm SEM).

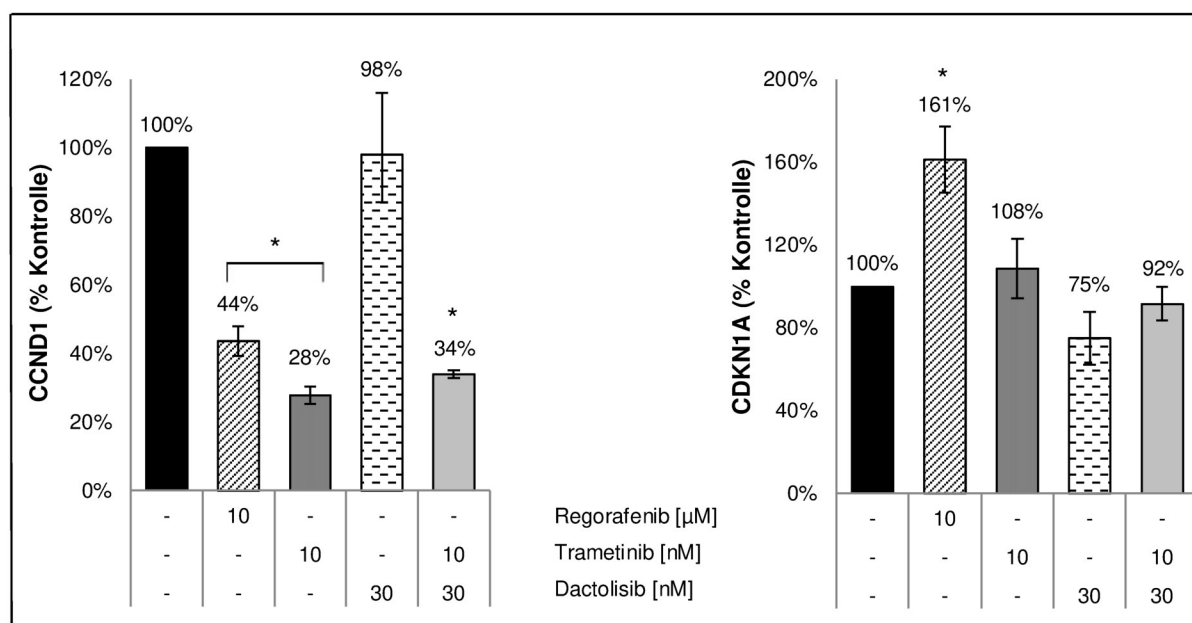
3.2.9 Einfluss der SMI auf die PSZ-Genexpression

Um die Wirkungen der Kinaseinhibitoren auf der Genexpressionsebene zu analysieren, wurden sechs der für die Sternzellfunktion relevanten Gene mittels *Real-time* PCR durch Nutzung der *TaqMan*-Technologie untersucht (Abb. 3.12). Für die PSZ-Aktivierung von Bedeutung sind das proinflammatorische Zytokin *IL-6* (Masamune und Shimosegawa, 2013) sowie *TGF- β 1* (Bachem *et al.*, 2005), welches der Hauptstimulator für die Produktion von extrazellulärer Matrix ist. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Matrix ist das *Kollagen Typ 1* (Bachem *et al.*, 1998), welches ebenfalls untersucht wurde. Des Weiteren wurde, als Marker des myofibroblastischen Phänotyps, α -SMA (Apte *et al.*, 1998) analysiert. Um die

Effekte der Kinaseinhibitoren auf den Zellzyklus zu eruieren, wurden die mRNA-Spiegel von *CCND1* sowie *CDKN1A* bestimmt (Viallard *et al.*, 2001).

Obwohl Regorafenib zu einem Anstieg der Zellproliferation führte, zeigte sich auf Genexpressionsebene eine Steigerung des Spiegels des Zellzyklusinhibitor *CDKN1A* bei gleichzeitiger Herunterregulierung von *CCND1*. Auf der anderen Seite kam es unter Regorafenib zu einer vermehrten Bildung von α -SMA- und einem tendenziellen Anstieg der *Kollagen Typ 1*-mRNA, obgleich der Spiegel des profibrogenetischen *TGF- β 1* sank. Eindrucksvoll war die stark hemmende Wirkung von Regorafenib auf das proinflammatorische Zytokin *IL-6*. Ähnliche Effekte auf Genexpressionsebene zeigte auch der MEK-Inhibitor Trametinib. Im Unterschied zu Regorafenib kam es aber zu keiner Beeinflussung des *CDKN1A*-Spiegels. Ein völlig anderes Genexpressionsmuster kam unter der Einwirkung des dritten Inhibitors zustande. Der Effekt von Dactolisib bestand v.a. in einer Hemmung der Expression von α -SMA und *Kollagen Typ 1*. Somit war Dactolisib der einzige der getesteten Kinaseinhibitoren mit direkt antifibrotischer Wirkung auf mRNA-Ebene. Die Expression der anderen untersuchten Gene (*CCND1*, *CDKN1A* und *IL-6*) wurde durch Dactolisib nicht beeinflusst.

Auch in diesem Versuch wurde überprüft, inwieweit sich die Wirkungen von Trametinib und Dactolisib ergänzen. Die Kombination beider SMI führte auf Genexpressionsebene zu einem Ausgleich der Einzeleffekte. In der Summe kam es zu einer Hemmung der Expression von *CCND1* sowie einer Herunterregulation der Spiegel von α -SMA und *Kollagen Typ 1*. Der antifibrotische Effekt von Dactolisib und die antiinflammatorische und zellzyklushemmende Wirkung von Trametinib blieben demnach bestehen.



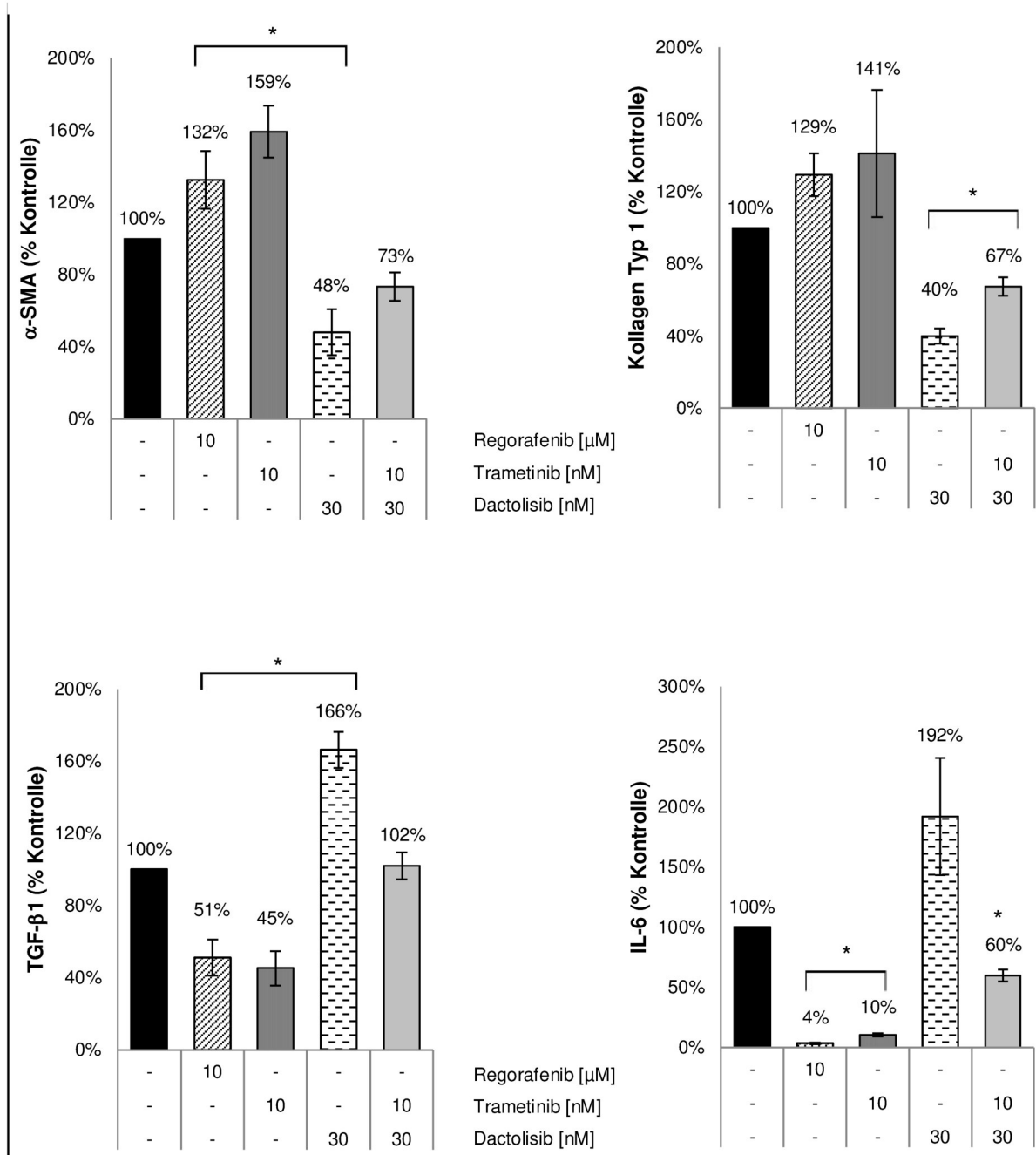


Abb. 3.12: Auswirkungen der SMI auf Genexpressionsebene

Primäre PSZ wurden für 24 h mit den angegebenen Inhibitoren einzeln oder als Kombination aus Trametinib und Dactolisib inkubiert. Die RNA wurde aus den Proben extrahiert und mittels Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die *TaqMan*-Technologie wurde genutzt, um unter Verwendung von *Assays on demand* die mRNA-Spiegel der gesuchten Gene zu bestimmen. Die Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte mittels $\Delta\Delta CT$ -Methode. In den Einzeldiagrammen sind jeweils die Mittelwerte (\pm SEM) aus fünf bis sechs unabhängigen Proben dargestellt. Für die Signifikanzanalyse wurde der Mann-Whitney-U-Test mit nachfolgender Bonferroni-Korrektur verwendet. Ein Unterschied wurde als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p < 0,0083$ gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe war [*].

3.2.10 Veränderung der IL-6-Sekretion durch die Einwirkung der Kinaseinhibitoren

Ein Ergebnis der Genexpressionsanalyse war die starke Verminderung des *IL-6*-mRNA-Spiegels durch Regorafenib und Trametinib. Um diesen Effekt auch auf Proteinebene zu verifizieren, wurde die IL-6-Zytokinkonzentration in Kulturmediumüberständen von 48 h mit Inhibitor behandelten PSZ bestimmt (Abb. 3.13). Es wurde deutlich, dass Regorafenib und Trametinib auch hier eine Hemmung der IL-6-Produktion bewirkten. Dieser Effekt war auch bei der Kombination aus Trametinib und Dactolisib feststellbar. Insgesamt betrachtet, fiel die hemmende Wirkung aber geringer aus als auf mRNA-Ebene.

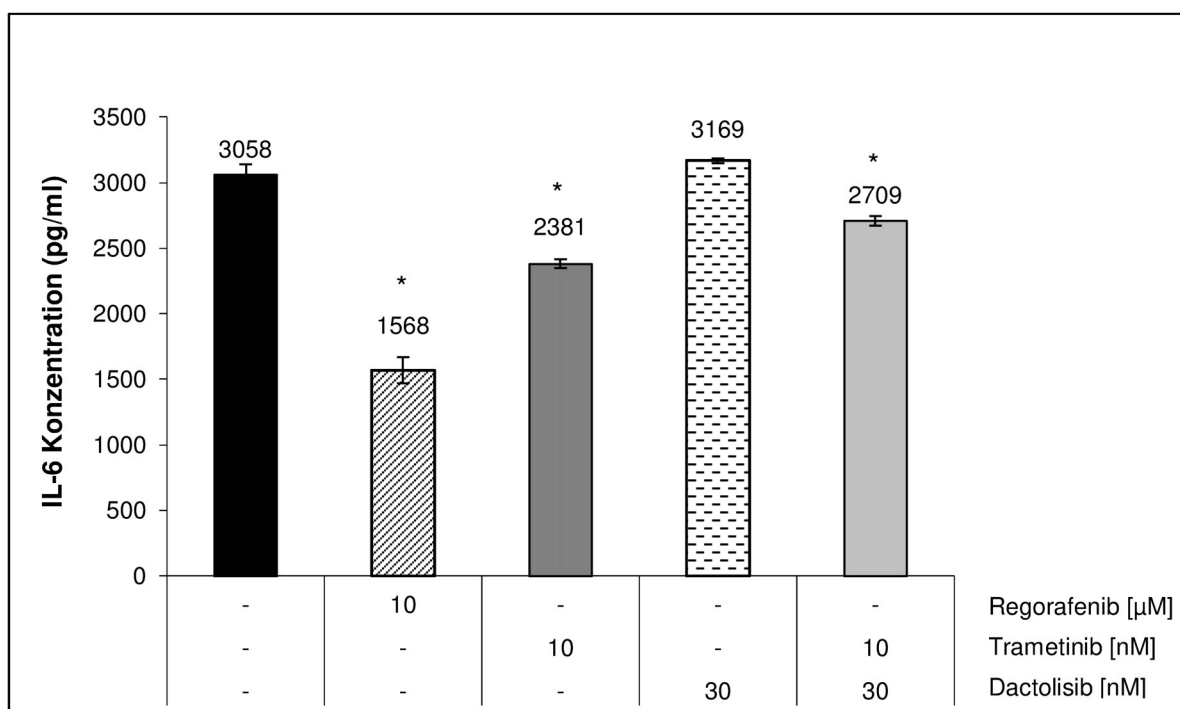


Abb. 3.13: Einfluss der SMI auf die Konzentration von IL-6 im Mediumüberstand

Nach 48-stündiger Inkubation von PSZ mit den angegebenen Kinaseinhibitoren wurde der Kulturmediumüberstand gewonnen, zentrifugiert und einer Analyse mittels IL-6-ELISA-Kit zugeführt. Nach Abschluss der Inkubationsschritte konnte die Absorption der Proben bei 450 nm am Photometer gemessen werden. Die Messwerte der sechs untersuchten Proben wurden mittels der Software *ELISAanalysis.com* analysiert. Dabei wurde das Verfahren der Vier-Parameter logistischen Regression verwendet. Um Signifikanzen festzustellen, wurde die einfaktorielle ANOVA mit nachgeschalteter Bonferroni-Korrektur verwendet. Als statistisch signifikant wurden Werte von $p < 0,0083$ [*] in Bezug zur unbehandelten Kontrolle akzeptiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM).

4 Diskussion

Sowohl die CP als auch das PK gehen mit einem bindegewebigen Umbau des Pankreas einher. Dadurch kommt es nicht nur zu einem schnelleren Fortschreiten der Grunderkrankung, sondern auch zu einem zunächst exokrinen und später auch endokrinen Funktionsverlust des Organs. Als Hauptakteure der Fibrose gelten PSZ. In dieser Arbeit wurden die Wirkungen von Kinaseinhibitoren auf PSZ in Bezug auf die Beeinflussung des Zellwachstums und des Zelltods, der Signaltransduktionsebene sowie des Genexpressionsniveaus untersucht. Die Experimente wurden als *in vitro* Studien zunächst an immortalisierten LTC-7-Zellen und später an Primärzellen von Ratten durchgeführt.

4.1 Auswirkungen der SMI auf LTC-7-Zellen

4.1.1 Veränderungen im Zellwachstum durch die Applikation von SMI

Die Proliferation von immortalisierten PSZ kann anhand des Einbaus von BrdU in die DNA beurteilt werden. Dazu wurden LTC-7-Zellen für 48 h mit vier Kinaseinhibitoren inkubiert. Vemurafenib wurde dabei in Konzentrationen von 1 bis 10 μM zu den Zellen gegeben. Eine Hemmung des Zellwachstums ließ sich durch den B-Raf^{V600E}-Inhibitor nicht erzielen. Dies lässt sich auf das Fehlen einer Mutation im B-Raf-Gen der LTC-7-Zellen zurückführen. Liegt B-Raf in seiner Wildtypform vor, so kann der Einsatz von Raf-Inhibitoren sogar einen Anstieg des Zellwachstums bewirken (Hatzivassiliou *et al.*, 2010). Daher wurde die Konzentration von Vemurafenib auch nicht gesteigert.

Der AKT-Inhibitor Perifosin wurde ebenfalls im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich auf seine wachstumshemmende Wirkung untersucht. Um signifikant das Wachstum unterdrücken zu können, war eine Konzentration von 20 μM Perifosin notwendig. Zwar war eine Reduktion des Zellwachstums schon bei 3 μM nachweisbar, dieser Effekt war aber bei 10 μM Perifosin nicht mehr signifikant. Eine konstante Dosis-Wirkungsbeziehung konnte für den AKT-Inhibitor demnach nicht aufgezeigt werden. Eine *in vitro* und *in vivo* Studie an Lungenkrebszellen (Zelllinien A549 und H460 sowie menschliche Tumorzellen von NSCLC-Patienten) belegte ebenfalls, dass die alleinige Gabe von Perifosin nur geringe wachstumshemmende Effekte ausübt (Shen *et al.*, 2016).

Regorafenib ist ein Multikinaseinhibitor, der über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich von 1 μM bis 10 μM signifikante Hemmwirkung auf die Zellproliferation entfaltete. Bei einer Zugabe von 10 μM SMI zu den immortalisierten Sternzellen ging deren Wachstum auf unter die Hälfte, verglichen mit Kontrollzellen, zurück. Dass Regorafenib inhibierende Wirkung auf Stromazellen aufweist, postulierte auch eine

Studie über das Kolonkarzinom aus dem Jahr 2016. Dabei wurden humane Kolonkarzinomzellen (KM12SM) mit oder ohne mesenchymale Stammzellen (differenziert zu Karzinom-assoziierten Fibroblasten) in Nacktmäuse transplantiert. Bei der Gruppe der co-transplantierten Tiere waren das Tumorwachstum, die Stromaausprägung und die Rate an lymphogener Metastasierung erhöht. Die daraufhin folgende Therapie mit Regorafenib reduzierte alle drei Parameter, indem es sowohl das Wachstum der Tumor- als auch der Stromazellen hemmte. Der Tumor konnte in co-transplantierten Mäusen stärker zurückgedrängt werden als in Mäusen, die nur Tumorzellen transplantiert bekommen hatten (Takigawa *et al.*, 2016).

Der MEK-Inhibitor Trametinib wirkte im Gegensatz zu den anderen drei SMI im nanomolaren Konzentrationsbereich. Bereits ab 1 nM war ein signifikanter Hemmeffekt zu verzeichnen. Bis zu einer 100-fach höheren Dosis von 100 nM war ein leichter, gleichmäßiger Abfall der Zellproliferation festzustellen.

4.1.2 Beeinflussung der Zytotoxizität durch Kinaseinhibitoren

Im Gegensatz zur Proliferationshemmung stellt der unspezifische und allgemein zellschädigende Effekt von Kinaseinhibitoren eine potenziell unerwünschte Wirkung dar. Da neben der Reduktion des Zellwachstums auch Zelltod eine Verminderung des BrdU-Einbaus hervorruft, ist es notwendig, die Zytotoxizität der eingesetzten SMI von ihrer wachstumshemmenden Wirkung abzugrenzen. Zur Quantifizierung der zellschädigenden Komponente wurde der *CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay* verwendet. Um die Inhibitoreffekte besser bewerten zu können, wurden neben Kontrollzellen auch mit Staurosporin inkubierte LTC-7-Zellen analysiert. Staurosporin wirkt proapoptisch, indem es die Bindung von Proteinkinasen an die DNA verhindert. In diesem Versuch diente es daher als Positivkontrolle für eine zytotoxische Wirkung. 61 % der Zellen waren nach zweitägiger Versuchszeit abgestorben. Demgegenüber waren nur 3 % der Kontrollzellen nicht mehr vital. Die zytotoxischen Eigenschaften der Kinaseinhibitoren waren von der eingesetzten Dosis abhängig. Mit steigender Konzentration war bei allen SMI ein Anstieg der abgestorbenen Zellen nachweisbar. Selbst Vemurafenib erhöhte die Zelltodrate auf 9 %, obwohl es bei LTC-7-Zellen keine proliferationsinhibierende Wirkung aufwies. Den stärksten zytotoxischen Effekt, obwohl gleichzeitig nicht signifikant, zeigte Perifosin in einer Konzentration von 20 µM. Bei dieser Dosis war es auch in der Proliferationsanalyse zu einer deutlich verstärkten Wachstumshemmung gekommen. Die fehlende Signifikanz ist unter Umständen auf die relativ geringe Anzahl untersuchter Proben (n=6) zurückzuführen. Dennoch liegt die Zelltodrate weit unter den Ergebnissen der Positivkontrolle. Somit ist davon auszugehen,

dass die zellschädigenden Effekte der SMI nur begrenzt sind und die proliferationshemmende Wirkung deutlich überwiegt.

4.1.3 Effekte der SMI auf Signaltransduktionsebene

Für PSZ sind zwei Signalwege von entscheidender Bedeutung: der PI3-K/AKT/mTOR- und der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg (Jaster *et al.*, 2002; Masamune *et al.*, 2003a; McCarroll *et al.*, 2004). Daher wurde mittels Western-Blot-Analysen überprüft, ob und in welchem Ausmaß die Kinaseinhibitoren zu einer Hemmung der betreffenden Signalwege führen. Dafür wurde für den PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg das Protein AKT in seiner phosphorylierten Form sowie als Gesamtprotein bestimmt. Für den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg wurden die Proteine ERK1/2 ebenfalls in der phosphorylierten Form und als Gesamtprotein quantifiziert. Der Quotient aus jeweils phosphoryliertem Protein zu Gesamtprotein zeigte dabei den Aktivierungszustand des Proteins an und ließ Rückschlüsse über die Hemmwirkung der SMI auf den dazugehörigen Signalweg zu.

Die Konzentration der Inhibitoren wurde anhand der Ergebnisse der Proliferationsanalysen ausgewählt und damit die LTC-7-Zellen für 15 h inkubiert. Es wurde entweder die niedrigste Konzentration verwendet, die einen sicheren Hemmeffekt erzielte oder die höchste im Proliferationsversuch getestete Konzentration, wenn es zu keiner Wachstumshemmung kam. Vemurafenib, in einer Konzentration von 10 μM , beeinflusste den Aktivierungszustand des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges nicht. Demgegenüber zeigte sich eine vermehrte Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges. Vemurafenib wird erfolgreich beim B-RAF^{V600E} mutiertem malignen Melanom eingesetzt. PSZ wie auch PK-Zellen weisen allerdings den Wildtyp dieses Gens auf. Hatzivassiliou *et al.* konnten anhand einer Untersuchung mit PLX-4720 und GDC-0879 an diversen Tumorzelllinien mit RAF- Wildtyp und K-ras-Mutation sowie an einem K-ras-mutiertem Lungenxenograftmodell beweisen, dass die Wirkung von RAF-Inhibitoren vom Genotyp abhängig ist. Während gegen B-RAF^{V600E} gerichtete SMI eine Hemmung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs bei mutiertem B-RAF auslösen, kann bei fehlender Mutation auch eine Aktivierung des Signalweges resultieren. Im Xenograftmodell war sogar eine Steigerung des Tumorwachstums nachzuvollziehen (Hatzivassiliou *et al.*, 2010).

Wie erwartet, zeigte Perifosin hemmende Effekte auf den PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg, ohne den Aktivierungsgrad des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs zu verändern. Die Beeinflussung des Spiegels an phosphoryliertem AKT stellte sich aber als instabil heraus. Aus der Verlängerung der FKS-Restimulationsdauer resultierte eine Aufhebung des Hemmeffektes von Perifosin.

Als konstant erwies sich hingegen der Einfluss von Regorafenib auf den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg. Über den gesamten Versuchszeitraum war eine deutliche Hemmung der P-ERK1/2/ERK-Spiegel nachzuvollziehen. Trotz seiner Funktion als Multikinaseinhibitor vermochte Regorafenib aber keine Herunterregulation des PI3-K/AKT/mTOR-Signalwegs zu bewirken. Eine *in vitro* Studie an der humanen Kolonkarzinomzelllinie RKO zeigte bezüglich der Beeinflussung des PI3-K/AKT/mTOR- und des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges ähnliche Ergebnisse. Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg wurde effektiv gehemmt, wohingegen der Anteil an phosphoryliertem AKT bei alleiniger Regorafenibgabe nicht reduziert wurde. Dies änderte sich jedoch in der Kombination mit dem Protein-D-Kinaseinhibitor CRT0066101, der als Einzelgabe ebenfalls zu keiner Veränderung des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges führte. Beide Inhibitoren in Kombination hatten aber eine synergistische Reduktion des P-AKT-Spiegels zur Folge (Wei *et al.*, 2015).

In ähnlicher Weise wie Regorafenib wirkte auch der MEK-Inhibitor Trametinib auf Signaltransduktionsebene. Es kam zu einer Reduktion des *downstream* von MEK gelegenen phosphorylierten ERK und damit zu einer effektiven Hemmwirkung auf den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg über den gesamten Versuchszeitraum. Bei kurzer Restimulationsdauer lag der Quotient aus phosphorylierter Form und Gesamtprotein nahe 0. Aber auch bei länger anhaltender FKS-Einwirkung stieg der Quotient nicht über 0,5 an.

Insgesamt zeigte sich demnach, dass drei der vier Inhibitoren den Aktivitätszustand des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges veränderten. Unter der Einwirkung von Regorafenib und Trametinib kam es zu einer Verminderung des Anteils an phosphoryliertem ERK, wohingegen Vemurafenib tendenziell aktivierende Effekte ausübte. Auf der anderen Seite reduzierte einzig Perifosin den Spiegel an phosphoryliertem AKT und wirkte damit auf den PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg.

4.1.4 Auswirkungen der LTC-7-Versuche auf die Experimente mit Primärzellen

Die Versuche an LTC-7-Zellen dienten dazu, die Wirkungsweise der einzelnen Kinaseinhibitoren an Sternzellen besser einschätzen zu können, um somit geeignete SMI auch für die Experimente an Primärzellen zu verwenden. Dazu wurde im Rahmen von Proliferations- und Zytotoxizitätsassays überprüft, in welchem Konzentrationsbereich wachstumshemmende Effekte eintreten und ob diese auf Zytotoxizität zurückzuführen sind. Ebenfalls wurden die für PSZ wichtigen Signalwege analysiert. Dabei zeigte sich, dass Vemurafenib trotz einer Steigerung der Dosis keine proliferationshemmende Wirkung aufwies und dennoch mehr Zellen geschädigt wurden als in der Kontrollgruppe. Des Weiteren führte Vemurafenib zu einer Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges. Deshalb wurde Vemurafenib nicht in die Versuche mit Primärzellen einbezogen.

Der AKT-Inhibitor Perifosin erzeugte zwar einen Rückgang der Zellproliferation, dennoch war keine konstante Dosis-Wirkungsbeziehung nachweisbar, obwohl der Spiegel an phosphoryliertem AKT effektiv gesenkt werden konnte. Als nachteilig erwies sich ebenfalls die im Vergleich zu den anderen Inhibitoren erhöhte Zytotoxizität. Daher wurde Perifosin durch einen anderen Kinaseinhibitor, das Dactolisib, ersetzt. Dactolisib ist im Gegensatz zu Perifosin nicht gegen AKT, sondern gegen die PI3-K und mTOR gerichtet. Die Intention war, durch diese vertikale Inhibition des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges eine stärkere molekulare und biologische Wirkung zu erzielen. Ein weiterer Anhaltspunkt für die Auswahl von Dactolisib war, dass eine Studie an einem Mausmodell der systemischen Sklerose und an dermalen Fibroblasten von Patienten mit systemischer Sklerose antifibrotische Effekte nachweisen konnte. Unter der Therapie mit Dactolisib reduzierten sich die Kollagenbündel sowie die Hautdicke bei den Mäusen. Außerdem waren weniger Col1a1 und α -SMA nachweisbar (Liang *et al.*, 2014).

Im Gegensatz zu Vemurafenib und Perifosin zeigten Regorafenib und Trametinib in allen Teilversuchen überzeugende Ergebnisse. Daher wurden sie für die Experimente an primären PSZ übernommen.

4.2 Effekte der SMI auf Primärzellen

4.2.1 Proliferationshemmende Wirkung der Kinaseinhibitoren

Auch bei den primären PSZ wurde zunächst der Einfluss der SMI auf das Zellwachstum untersucht. Dafür wurde der an den immortalisierten Zellen optimierte Konzentrationsbereich getestet. Der Konzentrationsbereich von Dactolisib orientierte sich dabei am ebenfalls im nanomolaren Dosisbereich wirkenden Trametinib.

Unerwartet war in diesem Versuch die proliferationsfördernde Wirkung von Regorafenib. Entgegen der Ergebnisse der LTC-7-Zellen steigerte dieser Kinaseinhibitor konzentrationsabhängig das Zellwachstum. Erst durch die Zusammenschau der Ergebnisse aus den folgenden Versuchen ist eine Interpretation dieser Wirkung möglich. Es bleibt aber festzuhalten, dass Regorafenib auch in anderen Studien nicht immer wachstumshemmende Effekte aufwies. So vermochte der SMI bei einer Untersuchung nur 19 von 25 humanen Kolorektalkarzinom-Zelllinien in ihrer Proliferation zu inhibieren (Schmieder *et al.*, 2014).

Auf der anderen Seite führten sowohl der MEK-Inhibitor Trametinib als auch der neu hinzugenommene dual wirkende SMI Dactolisib im nanomolaren Konzentrationsbereich zu einer konstanten Proliferationshemmung. Jeweils 100 nM des Inhibitors senkten die Wachstumsrate auf etwa 20 %, verglichen mit unbehandelten Zellen ab. Dabei zeigte Trametinib hier sogar eine stärkere proliferationshemmende Wirkung als bei den LTC-7-

Zellen, bei denen lediglich ein Rückgang des Wachstums auf 76 % zu verzeichnen war. Ein möglicher Erklärungsansatz bezieht sich auf das *SV40 large T-antigen*, welches der Immortalisierung von LTC-7-Zellen diene. Eine Studie an Fibroblasten von Mausembryonen und Enterozyten zeigte, dass die Transformation des *T-antigen* zu einer verstärkten Expression von Genen mit Bezug zur DNA-Replikation und -Reparatur, Chromatinanordnung und Zellzyklusprogression führte. Aber auch andere Gene, die nicht in den Zellzyklus eingreifen, wurden durch die Transformation in ihrer Aktivität beeinflusst. Einige der Effekte waren dabei auch vom untersuchten Zelltyp abhängig (Cantalupo *et al.*, 2009). Unter Umständen ist durch die Transformation eine verstärkte Robustheit der immortalisierten LTC-7-Zellen gegenüber antiproliferativen Wirkungen der SMI im Vergleich zu nicht transformierten Primärzellen erklärbar.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen liegen für Regorafenib im niedrigen mikromolaren sowie für Trametinib und Dactolisib im nanomolaren Wirkungsbereich. Klinisch sind diese Dosierungen für alle Inhibitoren als Plasmakonzentrationen erreichbar (Fazio *et al.*, 2016; Hellman *et al.*, 2015; Leonowens *et al.*, 2014). In weiterführenden Studien am Tiermodell könnte im nächsten Schritt untersucht werden, welcher Anteil der Plasmakonzentrationen unmittelbar an den Zielzellen zur Wirkung kommt.

4.2.2 Vorteile der Kombination aus Trametinib und Dactolisib auf das Zellwachstum

Im vorherigen Versuch wurde deutlich, dass sowohl Trametinib als auch Dactolisib die Zellproliferation effektiv und dosisabhängig hemmen. Da beide SMI an unterschiedlichen Signalwegen angreifen, erschien eine Kombination beider Kinaseinhibitoren als sinnvoll, um synergistische Wirkungen nutzen zu können. Dafür wurden der MEK-Inhibitor Trametinib und der mTOR- und PI3-K-Inhibitor Dactolisib in niedrigen Dosen miteinander kombiniert. In allen getesteten Dosiskombinationen war die proliferationshemmende Wirkung der Zweifachgabe jeweils größer als bei jeder der Substanzen alleine. Demnach ist von einem synergistischen Effekt von Trametinib und Dactolisib auf das Zellwachstum auszugehen.

Eine Studie an Zelllinien des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms mit EGFR- und K-ras-Mutation unterstreicht den Nutzen einer Kombinationstherapie. Durch die Zweifachgabe des PI3-K-Inhibitor BKM120 und des MEK-Inhibitors PD1056309 war es möglich, synergistische Effekte bezogen auf das Zellwachstum zu erzielen (Jiang *et al.*, 2016).

4.2.3 Zellschädigende Effekte der SMI

Verglichen mit der Zytotoxizität der Kinaseinhibitoren bei den immortalisierten Sternzellen, war bei allen Werten der Primärzellen ein Anstieg zu verzeichnen. Dieser Umstand ist aber bereits bei den unbehandelten Zellen nachvollziehbar gewesen, deren Anteil toter Zellen dreimal höher als im Versuch mit den LTC-7-Zellen lag. Daher ist der zytotoxische Effekt der Kinaseinhibitoren bei den primären PSZ nicht als höher zu bewerten. Keiner der SMI zeigte eine signifikante zytotoxische Wirkung, obwohl tendenziell der Anteil toter Zellen abhängig vom Inhibitor bis um den Faktor 2 anstieg. Am stärksten war dieser Effekt bei Dactolisib in den beiden höchsten Konzentrationen ausgeprägt. Die Kombination aus Trametinib und Dactolisib bietet hingegen nicht nur im Hinblick auf die Zellproliferation, sondern auch in Bezug auf die Zytotoxizität Vorteile. Alle getesteten Zweifachgaben lagen in der Analyse unter den gemessenen Einzelwerten von Dactolisib. Als Positivkontrolle wurde auch hier das proapoptische Staurosporin eingesetzt, welches als einzige Substanz eine signifikant höhere Zytotoxizität in Relation zur Kontrolle zeigte. Der Anteil toter Zellen lag hier bei 112 %. Aufgrund des Messverfahrens kam hier ein Wert über 100 % zustande. Die Analyse beruhte dabei nicht auf der Messung von absoluten Zellzahlen, sondern auf der Bestimmung von Lumineszenzen, die ins Verhältnis gesetzt wurden. Staurosporin war derart zytotoxisch, dass es zur Apoptose aller Zellen während des Versuches kam. Es erfolgte ein Abgleich mit der Gesamtzellzahl, die aufgrund von Abweichungen des Messinstruments leicht unterhalb der Rate an abgetöteten Zellen lag.

4.2.4 Einfluss der Kinaseinhibitoren auf Signaltransduktionsebene

Sowohl der PI3-K/AKT/mTOR- als auch der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellwachstums. Die Dosis der Inhibitoren wurde von den Versuchen an immortalisierten PSZ übernommen. Die Wirkung von Dactolisib auf Signaltransduktionsebene wurde im mittleren Konzentrationsbereich untersucht.

Blickt man auf die Ergebnisse der Regorafenib-Gabe bei LTC-7-Zellen zurück, so hemmte Regorafenib die Zellproliferation und führte zu einer verminderten Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges. Bei den Primärzellen zeigte sich ein anderes Bild. Der Kinaseinhibitor steigerte das Zellwachstum und hemmte nun nicht mehr den Ras/Raf/MEK/ERK-, sondern den PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg. Dies ist insoweit erklärbar, als dass Regorafenib ein Multikinaseinhibitor ist. Allerdings ist in der Literatur wesentlich häufiger eine Hemmung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges beschrieben. So senkte Regorafenib den Spiegel an phosphoryliertem ERK in humanen Pankreas- (Mia PaCa2), Kolon- (HCT 166, HT-29) und Brustkrebs- (MDA-MB-231) Zelllinien (Wilhelm *et al.*, 2004).

Eine andere Studie beschreibt hingegen die gleichförmige Senkung von phosphorylierten AKT- und ERK-Spiegeln unter der Einwirkung von Regorafenib bei humanen lymphatischen endothelialen Zellen (Schmieder *et al.*, 2014). Wenn man nun davon ausgeht, dass Regorafenib seine wachstumshemmende Wirkung verliert, da es nur noch zu einem Eingriff in den PI3-K/AKT/mTOR- und nicht mehr in den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg führt, so ist ein Blick auf den Effekt von Dactolisib auf Signaltransduktionsebene angebracht. Dieser dual wirkende Inhibitor hemmte wirksam den Spiegel an phosphoryliertem AKT auf gleichem Niveau wie Regorafenib, ohne in den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg einzugreifen. Deshalb ist davon auszugehen, dass die wachstumsfördernden Eigenschaften von Regorafenib bei Primärzellen auf hier nicht untersuchte Signalwege zurückzuführen sind.

Bei den primären PSZ vermochte nur Trametinib in den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg einzugreifen. Über den gesamten Versuchszeitraum hinweg lagen die Spiegel von phosphoryliertem zu Gesamt-ERK unter 50 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die auf der anderen Seite vorhandene Aktivierung des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges bei 5 und 20 min FKS-Restimulation wirkte sich offenbar nicht auf den wachstumshemmenden Effekt des MEK-Inhibitors aus, zumal die Aktivierung zeitlich begrenzt war. Die Wirkung ist aber dennoch unerwartet, da Trametinib üblicherweise nicht in den AKT-Signalweg eingreift. Eine transiente Aktivierung wurde aber bereits bei Zelllinien des kolorektalen Karzinoms beschrieben (Lange *et al.*, 2014).

4.2.5 Dosisabhängige Inhibition des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges durch Dactolisib

Eine höhere Konzentration von Kinaseinhibitoren führt zu einer stärkeren Beeinflussung des Zellwachstums. Im Fall von Dactolisib bedingte eine Steigerung der SMI-Dosis eine Verminderung der Proliferationsrate. Beispielhaft wurde dieser Inhibitor untersucht, um den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen auf den in diesem Fall adressierten PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg bestimmen zu können. Bei einer Dactolisib-Gabe von 10 nM wurde der PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg nicht signifikant beeinflusst. Ab einer Konzentration von 30 nM und noch deutlicher bei einer ausgewählten Dosis von 100 nM waren hemmende Effekte auf das angesteuerte Protein nachweisbar.

Daraus lässt sich schließen, dass eine Erhöhung der Inhibitorosis zu einer Verminderung des phosphorylierten AKT-Spiegels und damit zu weniger stark ausgeprägtem Zellwachstum führt. Es ist davon auszugehen, dass sich diese Effekte auch auf Trametinib und den davon adressierten Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg übertragen lassen. Rückschlüsse auf den Einfluss unterschiedlicher Dosierungen von Regorafenib lassen sich nicht ziehen, da es dort

zu keiner Inhibition des Wachstums kam und dennoch der PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg effektiv gehemmt wurde.

4.2.6 Veränderungen auf Signaltransduktionsebene durch die Kombination von Trametinib und Dactolisib

Bei der Untersuchung der Zellproliferation wurde deutlich, dass niedrige Einzeldosierungen von Trametinib und Dactolisib synergistische Hemmeffekte auf das Wachstum von Primärzellen aufweisen. Mit diesem Versuch sollte gezeigt werden, dass diese Wirkung auf Veränderungen der Signaltransduktion zurückzuführen ist. Dazu wurden mittlere Dosierungen (10 nM Trametinib und 30 nM Dactolisib) miteinander kombiniert und deren Einfluss auf den PI3-K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg mittels Western-Blot-Verfahren analysiert. Unter alleiniger Trametinib-Einwirkung war noch eine Steigerung des Aktivitätsgrades des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges nachzuvollziehen. Dieser Effekt wurde durch die Kombination mit Dactolisib nun in eine Verminderung des phosphorylierten AKT-Proteins transformiert. Die gleichzeitige Gabe von beiden SMI bewirkte keine Mittelung der Wirkungen zwischen Hemmung und Aktivierung des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges. Es resultierte demnach keine gegenseitige Aufhebung der Effekte, sondern eine Verschiebung der Wirkung in Richtung Dactolisib-Einzelgabe.

Auf Ebene des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges hingegen glichen sich die Einzelwirkungen stärker aus. Dennoch resultierte daraus insgesamt eine signifikante Reduktion des Spiegels an phosphoryliertem ERK.

Anhand dieses Versuchs wurde deutlich, dass die Kombination aus Dactolisib und Trametinib das Zellwachstum effektiver als die jeweiligen Einzelgaben hemmen kann, da durch die Kombination beide untersuchten Signalwege inhibiert werden.

4.2.7 Einfluss der SMI auf die Phosphorylierung der p70S6-Kinase

Downstream von mTOR befindet sich die p70S6-K im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg. Die Analyse ihres Phosphorylierungsgrades diente der Aktivitätsabschätzung nachgeschalteter Abschnitte dieses Signalweges. Signifikante Effekte konnten in diesem Versuch aufgrund der geringen Werteanzahl von $n=3$ nicht nachgewiesen werden. Tendenzen in der Wirkung sind aber dennoch ableitbar. Am stärksten ausgeprägt war die Inhibition der p70S6-K bei Dactolisib. Dies war zu erwarten, da Dactolisib dual die Phosphorylierung der direkt vorgeschalteten Proteine PI3-K und mTOR hemmt. Doch auch Regorafenib und Trametinib führten zu einer Hemmung der p70S6-Kinase, obwohl beide Inhibitoren den

Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg adressieren. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Verbindung des PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges über die p70S6-K besteht.

Die Interaktion der beiden in dieser Arbeit untersuchten Signalwege war bereits in Herzmuskel- und Aderhautmelanomzellen durch die Analyse der p70S6-K nachgewiesen worden (Babchia *et al.*, 2010; Iijima *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001).

4.2.8 Wirkung der Kinaseinhibitoren auf die Expression von α -SMA

Als Marker des myofibroblastischen Phänotyps von PSZ gilt das Zytoskelettprotein α -SMA. Dieses ordnet sich im aktivierten Zustand der Zellen zu Stressfasern an (Apte *et al.*, 1998). Eine Analyse auf Proteinebene sollte klären, ob die ausgewählten SMI die Expression von α -SMA hemmen, um damit Rückschlüsse auf eine mögliche Reduzierung des Aktivitätsgrades von PSZ ziehen zu können. Die Inkubationszeit der Kinaseinhibitoren betrug 48 h. Innerhalb dieses Zeitraums kam es unter keinem der SMI zu einer Veränderung im α -SMA Niveau. Möglicherweise ist dies auf die zu lange Halbwertszeit des Proteins zurückzuführen. Für Myofibroblasten der Aorta und der Lunge wurden Halbwertszeiten für α -SMA von etwa 72 h angegeben (Baouz *et al.*, 2005; Barja *et al.*, 1986). Um einen sicheren Effekt der Kinaseinhibitoren auf die Expression dieses Protein feststellen zu können, wäre eine Einwirkzeit von mehreren Halbwertszeiten notwendig gewesen. Eine solch lange Zeitspanne ist unter den gewählten Zellkulturbedingungen schwer umsetzbar, da die nötige Einsaatdichte der Zellen für ein Anwachsen der Zellen im Verbund zu niedrig gewesen wäre. Daher erfolgte die Evaluation der α -SMA-Expression ebenfalls auf mRNA-Ebene.

4.2.9 Beeinflussung der PSZ-Genexpression durch SMI

Ein Vorteil der Analyse von mRNA ist der frühzeitige Nachweis einer möglichen Wirkung von Kinaseinhibitoren auf Genexpressionsebene. Allerdings sind naturgemäß keine Aussagen über die für die biologischen Wirkungen der Genprodukte entscheidende Proteinebene möglich, so dass in Abhängigkeit von der Fragestellung ergänzende Untersuchungen sinnvoll bzw. notwendig sein können. Eingesetzt wurden die Inhibitoren in den Konzentrationen, die bereits bei der Analyse der Signalwege Verwendung fanden.

Untersucht wurden sechs Gene, die für die Funktion von Sternzellen von Bedeutung sind. Sowohl *CCND1* als auch *CDKN1A* wirken auf den Zellzyklus ein. Dabei codiert *CCND1* für Cyclin-D1, ein Protein, das nach Komplexbildung mit CDK4 oder 6 den Übertritt von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus ermöglicht. In vielen humanen Tumorentitäten findet eine Deregulation von Cyclin-D1 statt. Eine Studie an Pankreaskarzinompräparaten zeigte bereits in den 1990er Jahren, dass in 25 % der Fälle auf Southern-Blot-Ebene eine Überexpression

von *CCND1* vorlag. Auf mRNA-Ebene war dies sogar bei 82 % nachweisbar. Die Überexpression dieses Gens korrelierte dabei mit einem schlechteren Überleben der Patienten (Gansauge *et al.*, 1997). In der hier vorgenommenen Untersuchung führten sowohl Regorafenib als auch Trametinib eine Hemmung der Expression von *CCND1* herbei. Lediglich bei Dactolisib ließ sich keine Veränderung des mRNA-Spiegels nachweisen, allerdings bewirkte die Kombination mit Trametinib ein Absinken der *CCND1*-Expression.

Das p21^{waf1}-Protein wird durch das Gen *CDKN1A* codiert. Die Regulation dieses Gens findet hauptsächlich auf Transkriptionsebene statt. Das p21^{waf1}-Protein ist in der Lage, Cyclin-abhängige Kinasen zu hemmen und nimmt demnach die Stellung eines Zellzyklusinhibitors ein (Gartel und Radhakrishnan, 2005). Bei PSZ ist *CDKN1A* auch als Mediator von Seneszenz anzusehen (Fitzner *et al.*, 2013). Von allen untersuchten Kinaseinhibitoren steigerte nur Regorafenib die Expression von *CDKN1A*. Die anderen SMI beeinflussten den mRNA-Spiegel nicht.

Die zellzyklusinhibierenden Eigenschaften von Regorafenib, die über eine Hemmung von *CCND1* und *CDKN1A* auf mRNA-Ebene vermittelt werden, sind insofern unerwartet, als dass der Kinaseinhibitor das Zellwachstum letztendlich steigerte und nicht inhibierte. Wahrscheinlich sind Veränderungen in anderen, den Zellzyklus regulierenden und hier nicht untersuchten Genen dafür verantwortlich und/oder posttranslationale Modifikationen spielen eine Rolle.

Da der Nachweis einer Wirkung der Kinaseinhibitoren auf die Expression von α -SMA auf Proteinebene nicht möglich war, erfolgte die Analyse des Gens *α -SMA*. Die mRNA-Spiegel stiegen während der Inkubation mit Regorafenib und Trametinib an. Nur Dactolisib senkte das Niveau der *α -SMA* Expression. Aus der Kombination von Trametinib und Dactolisib ergab sich ein Ausgleich der Effekte und demnach keine Wirkung auf den *α -SMA*-Spiegel. Der myofibroblastische Phänotyp von PSZ blieb demnach auch nach Inkubation mit Regorafenib und Trametinib erhalten. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit anderen Befunden, die ebenfalls nahelegen, dass ein einmal ausgeprägter aktivierter PSZ-Phänotyp durch Kinaseinhibitoren nicht oder allenfalls partiell reversibel ist (Elsner *et al.* 2014). Ein realistisches Ziel des Einsatzes von Inhibitoren, wie den in dieser Arbeit untersuchten SMI, wäre demnach in erster Linie die Hemmung von Funktionen aktivierter PSZ, wie der Zellproliferation und der Expression profibrotischer Gene. Offen bleibt, ob die hier getesteten SMI imstande sind, die Aktivierung primär ruhender PSZ zu verhindern. Die praktische Relevanz eines solchen Effektes unter den Bedingungen des CP und des PK wäre ohnehin fraglich, da zahlreiche PSZ zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits im aktivierten Phänotyp vorliegen.

Kollagen Typ 1 ist der Hauptbestandteil der EZM und demnach entscheidend bei der Ausbildung der Pankreasfibrose. Kinaseinhibitoren, die in der Lage sind, Kollagen Typ 1 zu hemmen, verfügen demnach über antifibrotische Eigenschaften. In dieser Untersuchung traf dies für Dactolisib zu. Regorafenib und Trametinib allein konnten den *Kollagen Typ 1* mRNA-Spiegel nicht senken. Kombinierte man hingegen Dactolisib mit Trametinib, so überwog die antifibrotische Wirkung des PI3-K- und mTOR-Inhibitors.

Ein wesentlicher Stimulator für die Produktion von EZM ist TGF- β 1. Interessanterweise führte die Gabe von Dactolisib nicht zu einem Abfall der TGF- β 1-Spiegel, wie die Absenkung von *Kollagen Typ 1* vermuten ließ, sondern zu einem Anstieg. Eine Interpretation dieser Diskrepanz ist nur nach vertiefenden Folgestudien möglich, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich waren. Dafür hemmten Regorafenib und Trametinib das Niveau der TGF- β 1-Expression und wirken dadurch indirekt antifibrotisch. Die SMI verhielten sich demnach gegensinnig in Bezug auf die *Kollagen Typ 1*- und TGF- β 1-Expression. Die Kombination aus Trametinib und Dactolisib hob die jeweiligen Einzelwirkungen auf und hatte dementsprechend keinen Effekt. In einer neueren Studie aus dem Jahr 2016 wurde eine weitere Bedeutung von TGF- β eruiert. Hohe Spiegel an TGF- β (hauptsächlich TGF- β 1) hemmen die Produktion von Lumican. Lumican ist ein durch PSZ sezerniertes Proteoglykan, welches Kollagen zu Fibrillen anordnet. Ist die EZM reich an diesem Proteoglykan, so ist die Zelladhäsion und Mobilität von PSZ erhöht (Kang *et al.*, 2016). Eine weitere Untersuchung unterstrich die Bedeutung von Lumican für Patienten mit einem PK. War nach einer Operation das Biopat reich an Lumican, so verlängerte dies das Überleben der Patienten (Li *et al.*, 2014).

Über einen autokrinen Loop findet eine gegenseitige Beeinflussung der IL-6- und TGF β 1-Sekretion statt. Dieser Mechanismus wird über ERK- und Smad2/3- abhängige Signalwege vermittelt (Aoki *et al.*, 2006). Eine Analogie der Wirkungen der Kinaseinhibitoren auf beide Gene ist in Ansätzen erkennbar. So hemmten Regorafenib und Trametinib besonders effektiv die IL-6-Expression auf 4 bzw. 10 %, wohingegen unter dem Einfluss von Dactolisib keine Veränderung zu erkennen war. Kombinierte man Trametinib und Dactolisib miteinander, so überwog die inhibierende Wirkung von Trametinib. IL-6 ist ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin. Im Kontext der CP konnte gezeigt werden, dass IL-6 die Kollagenproduktion von PSZ sowie deren α -SMA-Expression beförderte (Mews *et al.*, 2002).

4.2.10 Wirkung der Kinaseinhibitoren auf die Ausschüttung von IL-6

In der Analyse der Genexpression war auffällig, dass insbesondere die *IL-6* mRNA-Spiegel durch zwei der drei SMI deutlich gesenkt werden konnten. Da eine Untersuchung auf Genebene den tatsächlichen Effekt, der letztendlich in einer veränderten Proteinmenge resultiert, nicht vollständig erfassen kann, erfolgte die Bestimmung des IL-6 Spiegels mittels ELISA im Kulturüberstand von mit Kinaseinhibitoren behandelten Zellen. Die Wirkung der SMI war analog zu den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen. Am stärksten inhibierte Regorafenib, gefolgt von Trametinib, die IL-6 Produktion. Obwohl Dactolisib alleine keine Wirkung hervorrief, führte die Kombination mit Trametinib zu einer Reduktion des IL-6 Spiegels. Insgesamt muss aber festgestellt werden, dass die Effekte auf Proteinebene deutlich geringer ausfielen als auf mRNA-Ebene. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass am Anfang der Inkubationszeit die Sekretion von IL-6 unabhängig vom Inhibitor verlief, da dieser zunächst zu seinen Zielstrukturen gelangen musste, um eine Signalkaskade zu aktivieren, die letztendlich über die Beeinflussung auf Genebene in einer verminderten Produktion von IL-6 mündete. Der ELISA detektierte aber alle während der Inkubationszeit sezernierten IL-6-Moleküle. Bei der Analyse auf mRNA-Ebene wurde hingegen der Zustand der Zellen nach der Inkubation untersucht.

4.2.11 Antifibrotische Effekte der SMI bei primären PSZ

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die antifibrotischen Effekte der Kinaseinhibitoren Regorafenib, Trametinib und Dactolisib auf primäre PSZ untersucht.

Fibrosierung beschreibt einen Prozess der bindegewebigen Umwandlung von Organparenchym. Als antifibrotische Effekte sind demnach Wirkungen zusammenzufassen, die eine vermehrte Bildung von Bindegewebe unterdrücken oder einen Untergang von bereits bestehendem Bindegewebe herbeiführen. PSZ sind ein wichtiger Produktionsort für EZM, indem sie v. a. Kollagen synthetisieren. Unter antifibrotischen Effekten ist demnach auch eine Hemmung der Proliferation der Sternzellen zu verstehen, da dann die EZM-Produktion vermindert wird. Zusätzlich sezernieren PSZ auch Zytokine wie TGF- β 1 und IL-6. TGF- β 1 ist der Hauptstimulator für die Bildung von Kollagen (Apte *et al.*, 1999). IL-6 ist pro-inflammatorisch wirksam und kann via para- und autokrinen Signalwegen die Aktivierung von PSZ aufrechterhalten bzw. herbeiführen (Aoki *et al.*, 2006). Daher ist eine Inhibition der Expression beider Zytokine als indirekt antifibrotischer Effekt anzusehen.

Die Tabelle 4.1 zeigt die antifibrotischen Effekte der untersuchten SMI in einer Übersicht.

	Regorafenib 10 μ M	Trametinib 10 nM	Dactolisib 30 nM
Zellproliferation	↑	↓	↓
Genexpression:			
- <i>Kollagen Typ 1</i>	=	=	↓
- <i>TGF-β1</i>	↓	↓	↑
- <i>IL-6*</i>	↓	↓	=

↑ signifikante Erhöhung des Parameters

↓ signifikante Erniedrigung des Parameters

= keine Veränderung (Die Angaben sind jeweils in Bezug zur unbehandelten Kontrolle zu betrachten.)

Tab. 4.1: Antifibrotische Effekte der Kinaseinhibitoren

Erfasst sind die Ergebnisse der BrdU-Proliferationsanalyse unter dem Punkt Zellproliferation (3.2.1) sowie der Genexpressionsanalyse mittels *Real-Time* PCR (3.2.9) bezüglich der Gene *Kollagen Typ 1*, *TGF- β 1* und *IL-6*. *Eine Verifizierung der erhobenen Daten ist auch auf Proteinebene erfolgt und bestätigte das Ergebnis (3.2.10).

Aus der Zusammenfassung der ausgewählten Ergebnisse geht hervor, dass alle untersuchten Kinaseinhibitoren antifibrotische Effekte aufweisen. Obwohl Regorafenib weder eine Inhibition des Zellwachstums herbeiführte, noch den mRNA-Spiegel von *Kollagen Typ 1* senkte, ist ein indirekt antifibrotischer Effekt über eine Hemmung von *TGF- β 1* und *IL-6* vorhanden. Trametinib weist sowohl direkte als auch indirekte antifibrotische Effekte auf. Bei diesem Inhibitor kommt es zu einer Reduzierung des Zellwachstums und zur analogen Wirkung auf die *TGF- β 1*- und *IL-6*-Spiegel wie beim Regorafenib. Einzig Dactolisib zeigte ausschließlich direkt antifibrotische Effekte, die über eine Hemmung der Zellproliferation und eine Absenkung des *Kollagen Typ 1*-Spiegels vermittelt werden. Es wäre zu erwarten gewesen, dass Regorafenib und Trametinib über einen Rückgang der *TGF- β 1*-Spiegel ebenfalls eine Hemmung von *Kollagen Typ 1* hervorrufen. Mögliche Gründe für ein Ausbleiben dieser Wirkung könnten zum einen in einer zu kurzen Betrachtungsdauer der Effekte auf Genexpressionsebene liegen. Ebenfalls nicht untersucht wurde der Einfluss der SMI auf andere Komponenten der EZM wie Kollagen Typ 3 und Laminin. Beide Punkte könnten in Folgestudien vertiefend betrachtet werden.

Eine Kombination aus Trametinib und Dactolisib maximierte das Potential der Proliferationshemmung und verband die direkt antifibrotische Wirkung des Dactolisibs mit der Absenkung des *IL-6*-Spiegels durch Trametinib. Es ist daher von einem verbesserten Wirkprofil bei einer Kombination beider SMI auszugehen, das nicht zulasten einer erhöhten Zytotoxizität ausfällt.

Nachfolgend sind in Abbildung 4.1 die wichtigsten Wirkungen der Kinaseinhibitoren bei primären PSZ dargestellt.

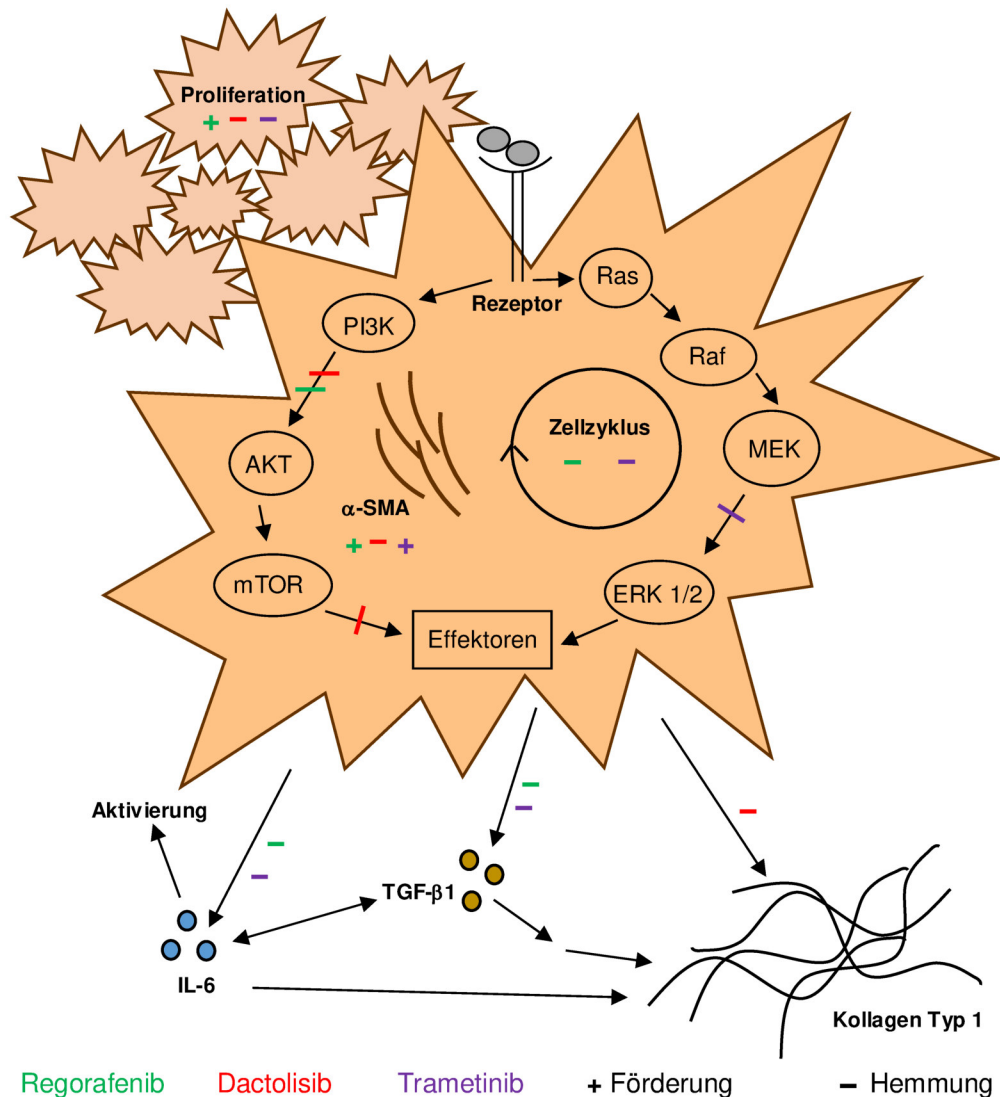


Abb. 4.1: Übersicht der SMI-Wirkungen auf primäre PSZ

Dieses Schema zeigt vereinfacht den Einfluss der SMI auf die Funktionen von PSZ. Aufgeführt sind die Veränderungen in Bezug auf die Zellproliferation sowie die verschiedenen Angriffspunkte auf Signaltransduktionsebene. Die Wirkungen der Kinaseinhibitoren auf die Expression von α -SMA, den Zellzyklus sowie die Expression von IL-6, TGF β -1 und Kollagen Typ 1 wurden auf der mRNA-Ebene untersucht sowie im Fall von IL-6 auch auf Proteinebene bestätigt. Angedeutet sind die vielfältigen und auch gegenseitigen Beeinflussungen zwischen den Mediatoren, die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher betrachtet wurden. Weitere Einzelheiten zu den entsprechenden Unterpunkten sind im jeweiligen Abschnitt im Ergebnis- bzw. Diskussionsteil erläutert.

4.3 Integrative Betrachtung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf *in vitro* Versuchen an immortalisierten und primären PSZ. Eine Verifizierung der gewonnenen Daten im Tiermodell wäre der nächste notwendige Schritt. Sollte sich auch dort zeigen, dass die getesteten Kinaseinhibitoren ihre antifibrotischen Effekte beibehalten, so könnte eine Überführung der SMI in klinische Studien erfolgen. Dies wäre ein langer und zeitintensiver Weg, allerdings ist von Vorteil, dass die ausgewählten Kinaseinhibitoren entweder bereits als Medikament beim Menschen zugelassen sind (Regorafenib und Trametinib) oder sich in fortgeschrittenen Phasen klinischer Studien bei anderen Erkrankungen befinden (Dactolisib). Es ist demnach davon auszugehen, dass Anforderungen hinsichtlich Nebenwirkungen, Teratogenität und Mutagenität erfüllt sind. Notwendig wäre v. a. der Nachweis einer Wirksamkeit beim Menschen.

Die Fibrosierung des Pankreas führt sowohl zu Funktionseinschränkungen als auch zur Progression der Grunderkrankung. Ob eine Reduzierung der fibrotischen Areale um das PK bzw. im Rahmen der CP tatsächlich als prognostisch günstig anzusehen ist, wurde noch nicht abschließend geklärt. Studien bei der CP haben diesen Aspekt bisher nicht systematisch erfasst. Beim PK gibt es unterschiedliche Auffassungen und Studienergebnisse über die prognoseverbessernden Aussichten einer Stromadepletion (siehe 1.2). Gelangt man in Zukunft zu der Erkenntnis, dass die Reduzierung der Pankreasfibrose beim PK ein verlängertes Überleben hervorruft, so würden sich insbesondere Dactolisib und Trametinib als Kinaseinhibitoren eignen. Eine Kombination von beiden SMI würde möglicherweise die erwünschten Wirkungen der Einzelsubstanzen verstärkt zur Ausprägung bringen. Stellt sich dagegen heraus, dass die den Organismus schützenden Eigenschaften von PSZ überwiegen und vielmehr eine Verminderung von Entzündungsmediatoren im Vordergrund stehen sollte, so würde sich Regorafenib als geeigneter Kinaseinhibitor anbieten.

Letztlich könnte eine antifibrotische Therapie bei der CP wie auch beim PK ein möglicher Baustein in einem multimodalen und interdisziplinären Therapiekonzept sein. Insbesondere beim PK wird eine Heilung auf absehbare Zeit nur über chirurgische Verfahren zu erzielen sein. Die Entwicklung neuer Medikamente dient daher in erster Linie der Verlängerung des Überlebens bei einer Zunahme an Lebensqualität. Ein möglicher Ansatzpunkt ist mit dieser Arbeit auf Zellebene konkretisiert worden.

5 Zusammenfassung

Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse gehen mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität Betroffener einher. Während bei der chronischen Pankreatitis (CP) Symptome der exokrinen und später auch endokrinen Organinsuffizienz dominieren, ist das Pankreaskarzinom (PK) v. a. durch seine schlechte Prognose gekennzeichnet. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bis heute unter 10 %. Beiden Erkrankungen gemeinsam ist der bindegewebige Umbau des Pankreas, was als Fibrose bezeichnet wird. Verantwortlich dafür sind überwiegend pankreatische Sternzellen (PSZ). In Folge einer Organschädigung gehen diese Zellen in einen aktivierten myofibroblastischen Zustand über und produzieren vermehrt Bestandteile der Extrazellulärmatrix wie Kollagen sowie Zytokine. Dieser Prozess dient der Wundheilung und ist zunächst als physiologisch anzusehen. Problematisch ist hingegen das Fortbestehen des Aktivierungszustandes, wie es bei der CP und beim PK der Fall ist. Das Fortschreiten der Fibrose bedingt dabei auch die Progression der Grunderkrankung. Bislang ist es nicht möglich, den bindegewebigen Organumbau therapeutisch zu adressieren.

Ziel dieser Arbeit war es daher, klinisch relevante Kinaseinhibitoren in einem *in vitro* Modell an immortalisierten sowie primären PSZ der Ratte auf ihre antifibrotische Wirkung zu untersuchen. Der Fokus lag dabei auf Substanzen, die zum einen in für die Sternzellaktivierung wichtige intrazelluläre Signalwege wie den PI3-K/AKT/mTOR- oder Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg eingreifen und die zum anderen bereits in der onkologischen Therapie eingesetzt oder klinisch getestet werden. Analysiert wurden im Rahmen dieser Arbeit die Effekte der SMI auf die Zellproliferation und die Ausbildung eines myofibroblastären Phänotyps sowie die Wirkungen der Pharmaka auf der Signaltransduktions- und Genexpressionsebene.

Versuche an immortalisierten PSZ dienten dabei der Auswahl geeigneter Inhibitoren sowie der Festlegung von adäquaten Konzentrationsbereichen. Der Multikinaseinhibitor Regorafenib senkte wie der MEK-Inhibitor Trametinib effektiv die Zellproliferation, wohingegen es unter der Einwirkung des AKT-Inhibitors Perifosin zu keiner konstanten Hemmung des Zellwachstums kam. Vemurafenib, welches B-RAF^{V600E} adressiert, führte wie erwartet zu keinem Rückgang der PSZ-Proliferation, da diese Mutation bei diesem Zelltyp nicht vorkommt. Auf Signaltransduktionsebene bewirkten sowohl Regorafenib als auch Trametinib einen deutlichen Rückgang des Spiegels an phosphoryliertem ERK. Perifosin führte zwar zu einer Verringerung des Aktivitätsgrades des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges, letztendlich wurde aber ein vielversprechenderer Inhibitor dieses Signalweges, das dual auf die Phosphatidylinositol 3-Kinase und mTOR wirkende Dactolisib, verfügbar, welches in den folgenden Versuchen Perifosin ersetzte.

Aufgrund der Ergebnisse der Studien an immortalisierten PSZ wurden in den darauf folgenden Untersuchungen an primären PSZ die Kinaseinhibitoren Regorafenib, Trametinib und Dactolisib getestet. Dabei wirkten sowohl Trametinib als auch Dactolisib in nanomolaren Konzentrationen antiproliferativ. Kombinierte man niedrige Dosierungen beider Inhibitoren, war ein synergistischer Effekt in Bezug auf das Zellwachstum nachzuvollziehen. Unerwartet kam es hingegen zu einer wachstumssteigernden Wirkung durch den Multikinaseinhibitor Regorafenib. Keiner der getesteten Inhibitoren zeigte eine signifikante Zytotoxizität, wenngleich tendenziell eine leicht erhöhte Rate an toten Zellen mit steigender Inhibitor dosierung zu beobachten war. Allerdings führte die Kombination aus Trametinib und Dactolisib zu keiner vermehrten Toxizität im Verhältnis zu den jeweiligen Einzelsubstanzen. Auch bei den primären PSZ erfolgte eine Analyse der SMI-Effekte auf Signaltransduktionsebene. War bei den immortalisierten PSZ unter der Einwirkung von Regorafenib eine Verminderung der Zellproliferation an eine Hemmung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges gekoppelt, so hemmte der SMI bei Primärzellen den PI3-K/AKT/mTOR-Signalweg bei gleichzeitiger Steigerung des Zellwachstums. Wodurch diese Unterschiede begründet sind, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht klären. Letztendlich kann eine alleinige Aktivitätsverminderung des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges, wie es ebenfalls bei Dactolisib festzustellen war, auch eine effektive Verringerung der Zellproliferation herbeiführen. Gezeigt werden konnte am Beispiel von Dactolisib, dass eine Erhöhung der SMI-Dosis mit einer verstärkten Wirkung auf Signaltransduktionsebene korreliert. Wie auch schon bei den immortalisierten PSZ bedingte der MEK-Inhibitor Trametinib bei primären PSZ eine Hemmung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges. Die Kombination von Dactolisib und Trametinib führte zu einem Eingriff in die beiden untersuchten Signalwege.

Keiner der getesteten Kinaseinhibitoren verringerte die Ausprägung des myofibroblastischen Aktivitätsmarkers α -SMA auf Proteinebene. Es bleibt dabei fraglich, ob die ausbleibende Wirkung durch den zu kurzen Untersuchungszeitraum begründet werden kann. Auf Genexpressionsebene hemmte lediglich Dactolisib den Spiegel an α -SMA, unter der Einwirkung von Regorafenib und Trametinib war hingegen ein Anstieg zu verzeichnen. Auf der anderen Seite griffen diese beiden SMI in den Zellzyklus ein. Es kam zu einer Hemmung von *CCND1* und bei Regorafenib zusätzlich zu einer Steigerung des Spiegels von *CDKN1A*. Dactolisib wirkte als einziger SMI auf Genexpressionsebene direkt antifibrotisch über eine Verringerung von *Kollagen Typ 1*. Hingegen waren Regorafenib und Trametinib indirekt antifibrotisch wirksam, indem sie eine Hemmung der Expression von *TGF- β 1* herbeiführten. Beide Inhibitoren besitzen ebenfalls antiinflammatorische Eigenschaften. Es kam zu einer Verringerung des *IL-6*-Spiegels auf mRNA-Ebene, die auch in Proteinanalysen bestätigt werden konnte.

Mit dieser Arbeit wurden im *in vitro* Modell mögliche Kinaseinhibitoren mit antifibrotischen Wirkungen aufgezeigt. Weiterführende Studien am Tiermodell könnten dazu beitragen, diesen Ansatz weiter zu vertiefen. Insbesondere die Kombination aus Trametinib und Dactolisib sollte dabei verstärkt untersucht werden. Fokussiert werden sollten dabei auch die Auswirkungen einer Stromadepletion bzw. die derzeit diskutierten Vorteile einer Stromamodifikation in Bezug auf die Progression der Grunderkrankung.

6 Thesen

1. Sowohl die chronische Pankreatitis als auch das Pankreaskarzinom gehen mit einer Fibrose des Pankreas einher, die das Fortschreiten beider Erkrankungen begünstigt.
2. Als Hauptakteure des bindegewebigen Umbaus gelten pankreatische Sternzellen (PSZ), die aktuell therapeutisch noch nicht adressiert werden können.
3. Ein geeignetes *in vitro* Modell sind PSZ der Ratte, an denen der Einsatz von spezifischen Kinaseinhibitoren (*small molecule kinase inhibitors; SMI*) als eine mögliche Therapieoption untersucht werden kann.
4. Der MEK-Inhibitor Trametinib wie auch der Multikinaseinhibitor Regorafenib hemmen effektiv das Wachstum immortalisierter PSZ.
5. Weiterführende Untersuchungen wurden an primären PSZ durchgeführt. Sowohl Trametinib als auch der dual wirksame Phosphatidylinositol 3-Kinase/mTOR-Inhibitor Dactolisib verringern im nanomolaren Dosisbereich die Proliferation von primären PSZ. Eine Kombination beider Inhibitoren hat synergistische Effekte in Bezug auf das Zellwachstum zur Folge. Im Gegensatz dazu bewirkt Regorafenib unerwartet eine Steigerung der Zellproliferation.
6. Die Wirkung der Kinaseinhibitoren ist nicht mit einer signifikant erhöhten Zytotoxizität assoziiert.
7. Seine wachstumshemmende Wirkung ruft Trametinib durch eine Inhibition des Ras/Raf/MEK/ERK- bzw. Dactolisib durch eine Verminderung der Aktivität des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges hervor.
8. Die qualitativ unterschiedlichen Wirkungen von Regorafenib auf das Wachstum immortalisierter und primärer PSZ gehen mit distinkten Effekten auf der Signaltransduktionsebene einher: Während Regorafenib bei immortalisierten Sternzellen eine Hemmung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges hervorruft, bewirkt der SMI bei primären PSZ vorrangig einen geringeren Aktivitätsgrad des PI3-K/AKT/mTOR-Signalweges.
9. Regorafenib besitzt über eine Hemmung der Expression von *CCND1* bei gleichzeitiger Steigerung der Expression von *CDKN1A* zellzyklusinhibierende Eigenschaften. Trametinib bewirkt ebenfalls eine Senkung des *CCND1*-Spiegels.
10. Der dual wirkende SMI Dactolisib zeigt direkt antifibrotische Effekte über eine Verringerung der *Kollagen Typ 1*-Expression, einem Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix. Regorafenib und Trametinib wirken hingegen nur indirekt antifibrotisch über eine Hemmung der Genexpression von *TGF-β1*.

11. Keiner der SMI führt zu einer verminderten Ausprägung des myofibroblastischen PSZ-Aktivitätsmarkers α -SMA in Proteinanalysen.
12. Sowohl Regorafenib als auch Trametinib verringern den Spiegel des proinflammatorischen und profibrotischen Zytokins IL-6 auf Genexpressions- und Proteinebene.
13. Der Stellenwert einer stromadepletierenden Therapie bei Erkrankungen mit umgebender Pankreasfibrose ist derzeit noch Gegenstand der Forschung. Unter Umständen ist eine Stromamodifikation einer reinen Depletion vorzuziehen.
14. Weiterführende Studien der hier untersuchten Kinaseinhibitoren am Tiermodell könnten helfen, die Thematik besser zu verstehen. Dabei sollten insbesondere die synergistischen Effekte von Trametinib und Dactolisib in vertiefenden Untersuchungen analysiert werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Amann, S. T.; Yadav, D.; Barmada, M. M.; O'Connell, M.; Kennard, E. D.; Anderson, M.; Baillie, J.; Sherman, S.; Romagnuolo, J.; Hawes, R. H.; Alkaade, S.; Brand, R. E.; Lewis, M. D.; Gardner, T. B.; Gelrud, A.; Money, M. E.; Banks, P. A.; Slivka, A.; Whitcomb, D. C. (2013). Physical and mental quality of life in chronic pancreatitis: a case-control study from the North American Pancreatitis Study 2 cohort. *Pancreas*, 42 (2), 293–300.
2. Ammann, R. W.; Muench, R.; Otto, R.; Buehler, H.; Freiburghaus, A. U.; Siegenthaler, W. (1988). Evolution and regression of pancreatic calcification in chronic pancreatitis. A prospective long-term study of 107 patients. *Gastroenterology*, 95 (4), 1018–1028.
3. Anderson, L. N.; Cotterchio, M.; Gallinger, S. (2009). Lifestyle, dietary, and medical history factors associated with pancreatic cancer risk in Ontario, Canada. *Cancer Causes & Control*, 20 (6), 825–834.
4. Anderson, M. A.; Akshintala, V.; Albers, K. M.; Amann, S. T.; Belfer, I.; Brand, R.; Chari, S.; Cote, G.; Davis, B. M.; Frulloni, L.; Gelrud, A.; Guda, N.; Humar, A.; Liddle, R. A.; Slivka, A.; Stopczynski Gupta, R.; Szigethy, E.; Talluri, J.; Wassef, W.; Wilcox, C. M.; Windsor, J.; Yadav, D.; Whitcomb, D. C. (2016). Mechanism, assessment and management of pain in chronic pancreatitis. Recommendations of a multidisciplinary study group. *Pancreatology*, 16 (1), 83–94.
5. Aoki, H.; Ohnishi, H.; Hama, K.; Shinozaki, S.; Kita, H.; Yamamoto, H.; Osawa, H.; Sato, K.; Tamada, K.; Sugano, K. (2006). Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in activated rat pancreatic stellate cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99 (1), 221–228.
6. Apte, M. V.; Haber, P. S.; Applegate, T. L.; Norton, I. D.; McCaughan, G. W.; Korsten, M. A.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S. (1998). Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*, 43 (1), 128–133.
7. Apte, M. V.; Haber, P. S.; Darby, S. J.; Rodgers, S. C.; McCaughan, G. W.; Korsten, M. A.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S. (1999). Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*, 44 (4), 534–541.
8. Apte, M. V.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S. (2012). Pancreatic stellate cells. A starring role in normal and diseased pancreas. *Frontiers in Physiology*, 3:344.
9. Apte, M. V.; Xu, Z.; Pothula, S.; Goldstein, D.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S. (2015). Pancreatic cancer: The microenvironment needs attention too! Focus on the role of alcohol in pancreatic and liver diseases - The 9th International Symposium on Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases and Cirrhosis, 15 (4, Supplement), 32–38.
10. Armstrong, T.; Packham, G.; Murphy, L. B.; Bateman, A. C.; Conti, J. A.; Fine, D. R.; Johnson, C. D.; Benyon, R. C.; Iredale, J. P. (2004). Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10 (21), 7427–7437.

11. Babchia, N.; Calipel, A.; Mouriaux, F.; Faussat, A. M.; Mascarelli, F. (2010). The PI3K/Akt and mTOR/P70S6K signaling pathways in human uveal melanoma cells: interaction with B-Raf/ERK. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51 (1), 421–429.
12. Bachem, M. G.; Schneider, E.; Gross, H.; Weidenbach, H.; Schmid, R. M.; Menke, A.; Siech, M.; Beger, H.; Grünert, A.; Adler, G. (1998). Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*, 115 (2), 421–432.
13. Bachem, M. G.; Schünemann, M.; Ramadani, M.; Siech, M.; Beger, H.; Buck, A.; Zhou, S.; Schmid-Kotsas, A.; Adler, G. (2005). Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology*, 128 (4), 907–921.
14. Bang, U. C.; Benfield, T.; Hyldstrup, L.; Bendtsen, F.; Beck Jensen, J. E. (2014). Mortality, cancer, and comorbidities associated with chronic pancreatitis: a Danish nationwide matched-cohort study. *Gastroenterology*, 146 (4), 989–994.
15. Baouz, S.; Giron-Michel, J.; Azzarone, B.; Giuliani, M.; Cagnoni, F.; Olsson, S.; Testi, R.; Gabbiani, G.; Canonica, G. W. (2005). Lung myofibroblasts as targets of salmeterol and fluticasone propionate: inhibition of alpha-SMA and NF-kappaB. *International Immunology*, 17 (11), 1473–1481.
16. Barja, F.; Coughlin, C.; Belin, D.; Gabbiani, G. (1986). Actin isoform synthesis and mRNA levels in quiescent and proliferating rat aortic smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 55 (2), 226–233.
17. Bendell, J. C.; Nemunaitis, J.; Vukelja, S. J.; Hagenstad, C.; Campos, L. T.; Hermann, R. C.; Sportelli, P.; Gardner, L.; Richards, D. A. (2011). Randomized Placebo-Controlled Phase II Trial of Perifosine Plus Capecitabine As Second- or Third-Line Therapy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29 (33), 4394–4400.
18. Berry, A. J. (2014). Pancreatic enzyme replacement therapy during pancreatic insufficiency. *Nutrition in Clinical Practice*, 29 (3), 312–321.
19. Bhowmick, N. A.; Neilson, E. G.; Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432 (7015), 332–337.
20. Binenbaum, Y.; Na'ara, S.; Gil, Z. (2015). Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Drug Resistance Updates*, 23, 55–68.
21. Blumenschein, G. R.; Smit, E. F.; Planchard, D.; Kim, D. W.; Cadranel, J.; Pas, T. de; Dunphy, F.; Udud, K.; Ahn, M.-J.; Hanna, N. H.; Kim, J.-H.; Mazieres, J.; Kim, S.-W.; Baas, P.; Rappold, E.; Redhu, S.; Puski, A.; Wu, F. S.; Janne, P. A. (2015). A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Annals of Oncology*, 26 (5), 894–901.
22. Braganza, J. M.; Lee, S. H.; McCloy, R. F.; McMahon, M. J. (2011). Chronic pancreatitis. *The Lancet*, 377 (9772), 1184–1197.

23. Brand, R. E.; Lerch, M. M.; Rubinstein, W. S.; Neoptolemos, J. P.; Whitcomb, D. C.; Hruban, R. H. Brentnall, T. A.; Lynch, H. T.; Canto, M. I. (2007). Advances in counselling and surveillance of patients at risk for pancreatic cancer. *Gut*, 56 (10), 1460–1469.
24. Cantalupo, P. G.; Saenz-Robles, M. T.; Rathi, A. V.; Beerman, R. W.; Patterson, W. H.; Whitehead, R. H. et al. (2009). Cell-type specific regulation of gene expression by simian virus 40 T antigens. *Virology*, 386 (1), 183–191.
25. Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296 (5573), 1655–1657.
26. Christein, J. D.; Kendrick, M. L.; Iqbal, C. W.; Nagorney, D. M.; Farnell, M. B. (2005). Distal pancreatectomy for resectable adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas. *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 9 (7), 922–927.
27. Chuang, E.; Barnard, D.; Hettich, L.; Zhang, X. F.; Avruch, J.; Marshall, M. S. (1994). Critical binding and regulatory interactions between Ras and Raf occur through a small, stable N-terminal domain of Raf and specific Ras effector residues. *Molecular and Cellular Biology*, 14 (8), 5318–5325.
28. Conroy, T.; Desseigne, F.; Ychou, M.; Bouche, O.; Guimbaud, R.; Becouarn, Y.; Adenis, A.; Raoul, J.-L.; Gourgou-Bourgade, S.; La Fouchardiere, C. de; Bennouna, J.; Bachet, J.-B.; Khemissa-Akouz, F.; Pere-Verge, D.; Delbaldo, C.; Assenat, E.; Chauffert, B.; Michel, P.; Montoto-Grillot, C.; Ducreux, M. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 364 (19), 1817–1825.
29. DaCosta Byfield, S.; Nash Smyth, E.; Mytelka, D.; Bowman, L.; Teitelbaum, A. (2013). Healthcare costs, treatment patterns, and resource utilization among pancreatic cancer patients in a managed care population. *Journal of Medical Economics*, 16 (12), 1379–1386.
30. Davies, H.; Bignell, G. R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M. J.; Bottomley, W.; Davis, N.; Dicks, E.; Ewing, R.; Floyd, Y.; Gray, K.; Hall, S.; Hawes, R.; Hughes, J.; Kosmidou, V.; Menzies, A.; Mould, C.; Parker, A.; Stevens, C.; Watt, S.; Hooper, S.; Wilson, R.; Jayatilake, H.; Gusterson, B. A.; Cooper, C.; Shipley, J.; Hargrave, D.; Pritchard-Jones, K.; Maitland, N.; Chenevix-Trench, G.; Riggins, G. J.; Bigner, D. D.; Palmieri, G.; Cossu, A.; Flanagan, A.; Nicholson, A.; Ho, J. W. C.; Leung, S. Y.; Yuen, S. T.; Weber, B. L.; Seigler, H. F.; Darrow, T. L.; Paterson, H.; Marais, R.; Marshall, C. J.; Wooster, R.; Stratton, M. R.; Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417 (6892), 949–954.
31. Del Chiaro, M.; Zerbi, A.; Falconi, M.; Bertacca, L.; Polese, M.; Sartori, N.; Boggi, U.; Casari, G.; Longoni, B. M.; Salvia, R.; Caligo, M.A.; Di Carlo, V.; Pederzoli, P.; Presciuttini, S.; Mosca, F. (2007). Cancer risk among the relatives of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology*, 7 (5-6), 459–469.

32. Diener, M. K.; Knaebel, H. P.; Heukauf, C.; Antes, G.; Büchler, M. W.; Seiler, C. M. (2007). A Systematic Review and Meta-analysis of Pylorus-preserving Versus Classical Pancreaticoduodenectomy for Surgical Treatment of Periapillary and Pancreatic Carcinoma. *Annals of Surgery*, 245 (2), 187–200.
33. Downward, J. (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Current Opinion in Cell Biology*, 10 (2), 262–267.
34. Duell, E. J. (2012). Epidemiology and potential mechanisms of tobacco smoking and heavy alcohol consumption in pancreatic cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 51 (1), 40–52.
35. Elsner, A.; Lange, F.; Fitzner, B.; Heuschkel, M.; Krause, B. J.; Jaster, R. (2014). Distinct antifibrogenic effects of erlotinib, sunitinib and sorafenib on rat pancreatic stellate cells. *World Journal of Gastroenterology*, 20 (24), 7914–7925.
36. Esposito, I.; Kleeff, J.; Bergmann, F.; Reiser, C.; Herpel, E.; Friess, H.; Schirmacher, P.; Büchler, M. W. (2008). Most Pancreatic Cancer Resections are R1 Resections. *Annals of Surgical Oncology*, 15 (6), 1651–1660.
37. Etemad, B.; Whitcomb, D. C. (2001). Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*, 120 (3), 682–707.
38. Fatima, J.; Schnelldorfer, T.; Barton, J.; Wood, C. M.; Wiste, H. J.; Smyrk, T. C.; Zhang, L.; Sarr, M. G.; Nagorney, D. M.; Farnell, M. B. (2010). Pancreatoduodenectomy for Ductal Adenocarcinoma. *Archives of Surgery*, 145 (2), 167–172.
39. Fazio, N.; Buzzoni, R.; Baudin, E.; Antonuzzo, L.; Hubner, R. A.; Lahner, H.; Herder, W. W. de; Raderer, M.; Teule, A.; Capdevila, J.; Libutti, S. K.; Kulke, M. H.; Shah, M.; Dey, D.; Turri, S.; Aimone, P.; Massacesi, C.; Verslype, C. (2016). A Phase II Study of BEZ235 in Patients with Everolimus-resistant, Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumours. *Anticancer Research*, 36 (2), 713–719.
40. Fendrich, V.; Langer, P.; Bartsch, D. K. (2014). Familial pancreatic cancer-status quo. *International Journal of Colorectal Disease*, 29 (2), 139–145.
41. Ferlay, J.; Steliarova-Foucher, E.; Lortet-Tieulent, J.; Rosso, S.; Coebergh, J. W. W.; Comber, H.; Forman, D.; Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49 (6), 1374–1403.
42. Fitzner, B.; Lange, A.; Müller, S.; Jaster, R. (2013). Cdkn1a is a key mediator of rat pancreatic stellate cell senescence. *Pancreatology*, 13 (3), 254–262.
43. Fitzner, B.; Müller, S.; Walther, M.; Fischer, M.; Engelmann, R.; Müller-Hilke, B.; Pützer, B. M.; Kreutzer, M.; Nizze, H.; Jaster, R. (2012). Senescence determines the fate of activated rat pancreatic stellate cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16 (11), 2620–2630.
44. Forsmark, C. E. (2013). Management of chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 144 (6), 1282–1291.
45. French, J. J.; Charnley, R. M. (2013). Chronic pancreatitis. *Surgery*, 31 (6), 304–309.

46. Froeling, F. E.; Feig, C.; Chelala, C.; Dobson, R.; Mein, C. E.; Tuveson, D. A.; Clevers, H.; Hart, I. R.; Kocher, H. M. (2011). Retinoic Acid–Induced Pancreatic Stellate Cell Quiescence Reduces Paracrine Wnt– β -Catenin Signaling to Slow Tumor Progression. *Gastroenterology*, 141 (4), 1486–1497.
47. Gansauge, S.; Gansauge, F.; Ramadani, M.; Stobbe, H.; Rau, B.; Harada, N.; Beger, H. G. (1997). Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. *Cancer Research*, 57 (9), 1634–1637.
48. Gartel, A. L.; Radhakrishnan, S. K. (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Research*, 65 (10), 3980–3985.
49. George, S.; Wang, Q.; Heinrich, M. C.; Corless, C. L.; Zhu, M.; Butrynski, J. E.; Morgan, J. A.; Wagner, A. J.; Choy, E.; Tap, W. D.; Yap, J. T.; Abbeele, A. D. van deen; Manola, J. B.; Solomon, S. M.; Fletcher, J. A.; Mehren, M. von; Demetri, G. D. (2012). Efficacy and Safety of Regorafenib in Patients With Metastatic and/or Unresectable GI Stromal Tumor After Failure of Imatinib and Sunitinib. A Multicenter Phase II Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 30 (19), 2401–2407.
50. Ghaneh, P.; Costello, E.; Neoptolemos, J. P. (2008). Biology and management of pancreatic cancer. *Postgraduate Medical Journal*, 84 (995), 478–497.
51. Gilmartin, A. G.; Bleam, M. R.; Groy, A.; Moss, K. G.; Minthorn, E. A.; Kulkarni, S. G.; Rominger, C. M.; Erskine, S.; Fisher, K. E.; Yang, J.; Zappacosta, F.; Annan, R.; Sutton, D.; Laquerre, S. G. (2011). GSK1120212 (JTP-74057) Is an Inhibitor of MEK Activity and Activation with Favorable Pharmacokinetic Properties for Sustained In Vivo Pathway Inhibition. *Clinical Cancer Research*, 17 (5), 989–1000.
52. Grothey, A.; van Cutsem, E.; Sobrero, A.; Siena, S.; Falcone, A.; Ychou, M.; Humblet, Y.; Bouché, O.; Mineur, L.; Barone, C.; Adenis, A.; Tabernero, J.; Yoshino, T.; Lenz, H.-J.; Goldberg, R. M.; Sargent, D. J.; Cihon, F.; Cupit, L.; Wagner, A.; Laurent, D. (2013). Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT). An international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 381 (9863), 303–312.
53. Gukovskaya, A. S.; Gukovsky, I.; Zaninovic, V.; Song, M.; Sandoval, D.; Gukovsky, S.; Pandol, S. J. (1997). Pancreatic Acinar Cells Produce, Release, and Respond to Tumor Necrosis Factor- α . Role in Regulating Cell Death and Pancreatitis. *Journal of Clinical Investigation*, 7, 1853–1862.
54. Gupta, S.; Wang, F.; Holly, E. A.; Bracci, P. M. (2010). Risk of pancreatic cancer by alcohol dose, duration, and pattern of consumption, including binge drinking. A population-based study. *Cancer Causes & Control*, 21 (7), 1047–1059.
55. Hatzivassiliou, G.; Song, K.; Yen, I.; Brandhuber, B. J.; Anderson, D. J.; Alvarado, R.; Ludlam, M. J. C.; Stokoe, D.; Gloor, S. L.; Vigers, G.; Morales, T.; Aliagas, I.; Liu, B.; Sideris, S.; Hoefflich, K. P.; Jaiswal, B. S.; Seshagiri, S.; Koeppen, H.; Belvin, M.; Friedman, L. S.; Malek, S. (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature*, 464 (7287), 431–435.

56. Heek, N. T. van; Meeker, A. K.; Kern, S. E.; Yeo, C. J.; Lillemoe, K. D.; Cameron, J. L.; Offerhaus, G. J. A.; Hicks, Je. L.; Wilentz, R. E.; Goggins, M. G.; Marzo, A. M. de; Hruban, R. H.; Maitra, A. (2002). Telomere Shortening Is Nearly Universal in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *The American Journal of Pathology*, 161 (5), 1541–1547.
57. Hellmann, M. D.; Sturm, I.; Trnkova, Z. J.; Lettieri, J.; Diefenbach, K.; Rizvi, N. A.; Gettinger, S. N. (2015). Preliminary Safety, Pharmacokinetics, and Efficacy of Regorafenib, Cisplatin, and Pemetrexed in Patients With Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancers. *Clinical Lung Cancer*, 16 (6), 514–522.
58. Hoff, D. D. von; Ervin, T.; Arena, F. P.; Chiorean, E. G.; Infante, J.; Moore, M.; Seay, T.; Tjulandin, S. A.; Ma, W. W.; Saleh, M. N.; Harris, M.; Reni, M.; Dowden, S.; Laheru, D.; Bahary, N.; Ramanathan, R. K.; Tabernero, J.; Hidalgo, M.; Goldstein, D.; Cutsem, E. van; Wei, X.; Iglesias, J.; Renschler, M. F. (2013). Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *New England Journal of Medicine*, 369 (18), 1691–1703.
59. Hoffmeister, A.; Mayerle, J.; Beglinger, C.; Buchler, M. W.; Bufler, P.; Dathe, K.; Folsch, U. R.; Friess, H.; Izbicki, J.; Kahl, S.; Klar, E.; Keller, J.; Knoefel, W. T.; Layer, P.; Loehr, M.; Meier, R.; Riemann, J. F.; Runzi, M.; Schmid, R. M.; Schreyer, A.; Tribl, B.; Werner, J.; Witt, H.; Mossner, J.; Lerch, M. M. (2012). S3-Consensus guidelines on definition, etiology, diagnosis and medical, endoscopic and surgical management of chronic pancreatitis German Society of Digestive and Metabolic Diseases (DGVS). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 50 (11), 1176–1224.
60. Hruban, R. H.; Goggins, M.; Parsons, J.; Kern, S. E. (2000). Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, (6), 2969–2972.
61. Hurton, S.; MacDonald, F.; Porter, G.; Walsh, M.; Molinari, M. (2014). The Current State of Pancreatic Cancer in Canada. *Pancreas*, 43 (6), 879–885.
62. Huxley, R.; Ansary-Moghaddam, A.; Berrington de González, A.; Barzi, F.; Woodward, M. (2005). Type-II diabetes and pancreatic cancer. A meta-analysis of 36 studies. *British Journal of Cancer*, 92 (11), 2076–2083.
63. Iijima, Y.; Laser, M.; Shiraishi, H.; Willey, C. D.; Sundaravadivel, B.; Xu, L.; McDermott, P. J.; Kuppaswamy, D. (2002). c-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (25), 23065–23075.
64. Ikejiri, N. (1990). The vitamin A-storing cells in the human and rat pancreas. *The Kurume Medical Journal*, (37), 67–81.
65. Iodice, S.; Gandini, S.; Maisonneuve, P.; Lowenfels, A. B. (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 393 (4), 535–545.
66. Jakubowiak, A. J.; Richardson, P. G.; Zimmerman, T.; Alsina, M.; Kaufman, J. L.; Kandarpa, M.; Kraftson, S.; Ross, C. W.; Harvey, C.; Hideshima, T.; Sportelli, P.; Poradosu, E.; Gardner, L.; Giusti, K.; Anderson, K. C. (2012). Perifosine plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma: a Phase I Multiple Myeloma Research Consortium study. *British Journal of Haematology*, 158 (4), 472–480.

67. Jaster, R. (2004). Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Molecular Cancer*, 3: 26.
68. Jaster, R.; Hilgendorf, I.; Fitzner, B.; Brock, P.; Sparmann, G.; Emmrich, J.; Liebe, S. (2003). Regulation of pancreatic stellate cell function in vitro. Biological and molecular effects of all-trans retinoic acid. *Biochemical Pharmacology*, 66 (4), 633–641.
69. Jaster, R.; Lichte, P.; Fitzner, B.; Brock, P.; Glass, A.; Karopka, T.; Gierl, L.; Koczan, D.; Thiesen, H.-J.; Sparmann, G.; Emmrich, J.; Liebe, S. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression inhibits pro-fibrogenic activities of immortalised rat pancreatic stellate cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9 (3), 670–682.
70. Jaster, R.; Sparmann, G.; Emmrich, J.; Liebe, S. (2002). Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut*, 51 (4), 579–584.
71. Jiang, Z.-B.; Huang, J.; Xie, C.; Li, X.; Liu, L.; He, J.; Pan, H.; Huang, L.; Fan, X.-X.; Yao, X.-J.; Xie, Y.; Li, N.; Liu, L.; He, J.-X.; Leung, E. L.-H. (2016). Combined use of PI3K and MEK inhibitors synergistically inhibits lung cancer with EGFR and KRAS mutations. *Oncology Reports*. 36(1):365-75.
72. Joergensen, M. T.; Brusgaard, K.; Crüger, D. G.; Gerdes, A.-M.; Schaffalitzky de Muckadell, O. B. (2010). Genetic, Epidemiological, and Clinical Aspects of Hereditary Pancreatitis. A Population-Based Cohort Study in Denmark. *The American Journal of Gastroenterology*, 105 (8), 1876–1883.
73. Jones, S.; Zhang, X.; Parsons, D. W.; Lin, J. C.-H.; Leary, R. J.; Angenendt, P.; Mankoo, P.; Carter, H.; Kamiyama, H.; Jimeno, A.; Hong, S.-M.; Fu, B.; Lin, M.-T.; Calhoun, E. S.; Kamiyama, M.; Walter, K.; Nikolskaya, T.; Nikolsky, Y.; Hartigan, J.; Smith, D. R.; Hidalgo, M.; Leach, S. D.; Klein, A. P.; Jaffee, E. M.; Goggins, M.; Maitra, A.; Iacobuzio-Donahue, C.; Eshleman, J. R.; Kern, S. E.; Hruban, R. H.; Karchin, R.; Papadopoulos, N.; Parmigiani, G.; Vogelstein, B.; Velculescu, V. E.; Kinzler, K. W. (2008). Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science*, 321 (5897), 1801–1806.
74. Joseph, E. W.; Pratilas, C. A.; Poulikakos, P. I.; Tadi, M.; Wang, W.; Taylor, B. S.; Halilovic, E.; Persaud, Y.; Xing, F.; Viale, A.; Tsai, J.; Chapman, P. B.; Bollag, G.; Solit, D. B.; Rosen, N. (2010). The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (33), 14903–14908.
75. Kanda, M.; Matthaei, H.; Wu, J.; Hong, S.; Yu, J.; Borges, M.; Hruban, R. H.; Maitra, A.; Kinzler, K.; Vogelstein, B.; Goggins, M. (2012). Presence of Somatic Mutations in Most Early-Stage Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Gastroenterology*, 142 (4), 730–733.
76. Kang, Y.; Roife, D.; Lee, Y.; Lv, H.; Suzuki, R.; Ling, J.; Rios Perez, M. V.; Li, X.; Dai, B.; Pratt, M.; Truty, M. J.; Chatterjee, D.; Wang, H.; Thomas, R. M.; Wang, Y.; Koay, E. J.; Chiao, P. J.; Katz, M. H.; Fleming, J. B. (2016). Transforming Growth Factor-beta Limits Secretion of Lumican by Activated Stellate Cells within Primary Pancreatic Adenocarcinoma Tumors. *Clinical Cancer Research*, 22 (19), 4934–4946.
77. Keller, J.; Layer, P. (2008). Idiopathic chronic pancreatitis. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 22 (1), 105–113.

78. Klöppel G.; Maillet, B. (1992). The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology*, 420 (1), 1–4.
79. Klöppel, G.; Solcia, E.; Longnecker, D. S.; Capella, C.; Sobin, L. H. (1996). *Histological Typing of Tumours of the Exocrine Pancreas*. 2. Auflage. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
80. Kondapaka, S. B.; Singh, S. S.; Dasmahapatra, G. P.; Sausville, E. A.; Roy, K. K. (2003). Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2 (11), 1093–1103.
81. Kruse, M. L.; Hildebrand, P. B.; Timke, C.; Fölsch, U. R.; Schmidt, W. E. (2000). TGF β 1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells / stellate cells in vitro. *Regulatory Peptides*, 90, 47–52.
82. Kuniyasu, H.; Abbruzzese, J. L.; Cleary, K. R.; Fidler, I. J. (2001). Induction of ductal and stromal hyperplasia by basic fibroblast growth factor produced by human pancreatic carcinoma. *International Journal of Oncology*, 19 (4), 681–685.
83. Lang, M. B.; Segersvard, R.; Grundsten, M.; Segerdahl, M.; Arnelo, U.; Permert, J.; Franck, J.; Löhr, M.; Tsai, J. A. (2012). Management of alcohol use disorders in patients with chronic pancreatitis. *Journal of the Pancreas*, 13 (6), 654–659.
84. Lange, F.; Franz, B.; Maletzki, C.; Linnebacher, M.; Hühns, M.; Jaster, R. (2014). Biological and Molecular Effects of Small Molecule Kinase Inhibitors on Low-Passage Human Colorectal Cancer Cell Lines. *BioMed research international*, 2014 (11), 1–13.
85. LaRusch, J.; Whitcomb, D. C. (2011). Genetics of pancreatitis. *Current Opinion in Gastroenterology*, 27 (5), 467–474.
86. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2013): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, AWMF Registernummer: 032-010OL. Online verfügbar unter <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>, zuletzt geprüft am 18.11.2016.
87. Leonowens, C.; Pendry, C.; Bauman, J.; Young, G. C.; Ho, M.; Henriquez, F.; Fang, L.; Morrison, R. A.; Orford, K.; Ouellet, D. (2014). Concomitant oral and intravenous pharmacokinetics of trametinib, a MEK inhibitor, in subjects with solid tumours. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 78 (3), 524–532.
88. Li, X.; Truty, M. A.; Kang, Y.; Chopin-Laly, X.; Zhang, R.; Roife, D.; Chatterjee, D.; Lin, E.; Thomas, Ry. M.; Wang, H.; Katz, M. H.; Fleming, J. B. (2014). Extracellular lumican inhibits pancreatic cancer cell growth and is associated with prolonged survival after surgery. *Clinical Cancer Research*, 20 (24), 6529–6540.
89. Liang, M.; Lv, J.; Chu, H.; Wang, J.; Chen, X.; Zhu, X.; Xue, Y.; Guan, M.; Zou, H. (2014). Vertical inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling demonstrates in vitro and in vivo anti-fibrotic activity. *Journal of Dermatological Science*, 76 (2), 104–111.
90. Logsdon, C. D.; Lu, W. (2016). The Significance of Ras Activity in Pancreatic Cancer Initiation. *International Journal of Biological Sciences*, 12 (3), 338–346.

91. Löhr, M.; Klöppel, G.; Maisonneuve, P.; Lowenfels, A. B.; Lüttges, J. (2005). Frequency of K-ras Mutations in Pancreatic Intraductal Neoplasias Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis. A Meta-Analysis. *Neoplasia*, 7 (1), 17–23.
92. Löhr, M.; Schmidt, C.; Ringel, J.; Kluth, M.; Müller, P.; Nizze, H.; Jesnowski, R. (2001). Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Research*, 61 (2), 550–555.
93. Luttenberger, T.; Schmid-Kotsas, A.; Menke, A.; Siech, M.; Beger, H.; Adler, G.; Grünert, A.; Bachem, M. G. (2000). Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Laboratory investigation*, 80 (1), 47–55.
94. Maira, S.-M.; Stauffer, F.; Brueggen, J.; Furet, P.; Schnell, C.; Fritsch, C.; Brachmann, S.; Chene, P.; Pover, A. de; Schoemaker, K.; Fabbro, D.; Gabriel, D.; Simonen, M.; Murphy, L.; Finan, P.; Sellers, W.; Garcia-Echeverria, C. (2008). Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7 (7), 1851–1863.
95. Maitra, A.; Kern, S. E.; Hruban, R. H. (2006). Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 20 (2), 211–226.
96. Masamune, A.; Kikuta, K.; Satoh, M.; Kume, K.; Shimosegawa, T. (2003a). Differential roles of signaling pathways for proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 199 (2), 69–84.
97. Masamune, A.; Kikuta, K.; Satoh, M.; Sakai, Y.; Satoh, A.; Shimosegawa, T. (2002). Ligands of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- Block Activation of Pancreatic Stellate Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (1), 141–147.
98. Masamune, A.; Kikuta, K.; Satoh, M.; Satoh, K.; Shimosegawa, T. (2003b). Rho kinase inhibitors block activation of pancreatic stellate cells. *British Journal of Pharmacology*, 140 (7), 1292–1302.
99. Masamune, A.; Kikuta, K.; Suzuki, N.; Satoh, M.; Satoh, K.; Shimosegawa, T. (2004). A c-Jun NH2-Terminal Kinase Inhibitor SP600125 (Anthra[1,9-cd]pyrazole-6 (2H)-one) Blocks Activation of Pancreatic Stellate Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310 (2), 520–527.
100. Masamune, A.; Kikuta, K.; Watanabe, T.; Satoh, K.; Satoh, A.; Shimosegawa, T. (2008). Pancreatic stellate cells express Toll-like receptors. *Journal of Gastroenterology*, 43 (5), 352–362.
101. Masamune, A.; Satoh, M.; Kikuta, K.; Sakai, Y.; Satoh, A.; Shimosegawa, T. (2003c). Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Blocks Activation of Rat Pancreatic Stellate Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304 (1), 8–14.
102. Masamune, A.; Shimosegawa, T. (2013). Pancreatic stellate cells-Multi-functional cells in the pancreas. *Pancreatology*, 13 (2), 102–105.

103. Mathew, E.; Brannon, A. L.; Del Vecchio, A.; Garcia, P. E.; Penny, M. K.; Kane, K. T.; Vinta, A.; Buckanovich, R. J.; Di Magliano, M. P. (2016). Mesenchymal Stem Cells Promote Pancreatic Tumor Growth by Inducing Alternative Polarization of Macrophages. *Neoplasia*, 18 (3), 142–151.
104. Mato, E.; Lucas, M.; Petriz, J.; Gomis, R.; Novials, A. (2009). Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells. New role for stellate cells in the pancreas. *Biochemical Journal*, 421 (2), 181–191.
105. McCarroll, J. A.; Phillips, P. A.; Kumar, R. K.; Park, S.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S.; Apte, M. V. (2004). Pancreatic stellate cell migration. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) pathway. *Biochemical Pharmacology*, 67 (6), 1215–1225.
106. McCarroll, J. A.; Phillips, P. A.; Park, S.; Doherty, E.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S.; Apte, M. V. (2003). Pancreatic stellate cell activation by ethanol and acetaldehyde: is it mediated by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway? *Pancreas*, 27 (2), 150–160.
107. McCubrey, J. A.; Steelman, L. S.; Chappell, W. H.; Abrams, S. L.; Wong, E. W. T.; Chang, F.; Lehmann, B.; Terrian, D. M.; Milella, M.; Tafuri, A.; Stivala, F.; Libra, M.; Basecke, J.; Evangelisti, C.; Martelli, A. M.; Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1773 (8), 1263–1284.
108. Meier, R.; Ockenga, J.; Pertkiewicz, M.; Pap, A.; Milinic, N.; Macfie, J. et al. (2006). ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Pancreas. *Clinical Nutrition*, 25 (2), 275–284.
109. Mews, P.; Phillips, P.; Fahmy, R.; Korsten, M.; Pirola, R.; Wilson, J.; Apte, M. V. (2002). Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut*, 50 (4), 535–541.
110. Miyamoto, H.; Murakami, T.; Tsuchida, K.; Sugino, H.; Miyake, H.; Tashiro, S. (2004). Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas*, 28 (1), 38–44.
111. Moore, M. J.; Goldstein, D.; Hamm, J.; Figer, A.; Hecht, J. R.; Gallinger, S.; Au, H. J.; Murawa, P.; Walde, D.; Wolff, R. A.; Campos, D.; Lim, R.; Ding, K.; Clark, G.; Voskoglou-Nomikos, T.; Ptasynski, M.; Parulekar, W. (2007). Erlotinib Plus Gemcitabine Compared With Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Cancer. A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology*, 25 (15), 1960–1966.
112. Mullady, D. K.; Yadav, D.; Amann, S. T.; O'Connell, M. R.; Barmada, M. M.; Elta, G. H.; Scheiman, J. M.; Wamsteker, E.-J.; Chey, W. D.; Korneffel, M. L.; Weinman, B. M.; Slivka, A.; Sherman, S.; Hawes, R. H.; Brand, R. E.; Burton, F. R.; Lewis, M. D.; Gardner, T. B.; Gelrud, A.; DiSario, J.; Baillie, J.; Banks, P. A.; Whitcomb, D. C.; Anderson, M. A. (2011). Type of pain, pain-associated complications, quality of life, disability and resource utilisation in chronic pancreatitis: a prospective cohort study. *Gut*, 60 (1), 77–84.
113. Muniraj, T.; Aslanian, H. R.; Farrell, J.; Jamidar, P. A. (2014). Chronic pancreatitis, a comprehensive review and update. Part I: epidemiology, etiology, risk factors, genetics, pathophysiology, and clinical features. *Disease-a-Month*, 60 (12), 530–550.

114. Neoptolemos, J. P.; Stocken, D. D.; Bassi, C.; Ghaneh, P.; Cunningham, D.; Goldstein, D.; Padbury, R.; Moore, M. J.; Gallinger, S.; Mariette, C.; Wente, M. N.; Izbicki, J. R.; Friess, H.; Lerch, M. M.; Dervenis, C.; Olah, A.; Butturini, G.; Doi, R.; Lind, P. A.; Smith, D.; Valle, J. W.; Palmer, D. H.; Buckels, J. A.; Thompson, J.; McKay, C. J.; Rawcliffe, C. L.; Buchler, M. W. (2010). Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 304 (10), 1073–1081.
115. Oettle, H.; Post, S.; Neuhaus, P.; Gellert, K.; Langrehr, J.; Ridwelski, K.; Schramm, H.; Fahlke, J.; Zuelke, C.; Burkart, C.; Gutberlet, K.; Kettner, E.; Schmalenberg, H.; Weigang-Koehler, K.; Bechstein, W.-O.; Niedergethmann, M.; Schmidt-Wolf, I.; Roll, L.; Doerken, B.; Riess, H. (2007). Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer. *Journal of the American Medical Association*, 297 (3), 267–277.
116. Özdemir, B. C.; Pentcheva-Hoang, T.; Carstens, J. L.; Zheng, X.; Wu, C.-C.; Simpson, T. R.; Laklai, H.; Sugimoto, H.; Kahlert, C.; Novitskiy, S. V.; De Jesus-Acosta, A.; Sharma, P.; Heidari, P.; Mahmood, U.; Chin, L.; Moses, H. L.; Weaver, V. M.; Maitra, A.; Allison, J. P.; LeBleu, V. S.; Kalluri, R. (2014). Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell*, 25 (6), 719–734.
117. Pearson, G.; Robinson, F.; Gibson, T. B.; Xu, B.; Karandikar, M.; Berman, K.; Cobb, M. H. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*, 22 (2), 153–183.
118. Pettitrossi, V.; Santi, A.; Imperi, E.; Russo, G.; Pucciarini, A.; Bigerna, B.; Schiavoni, G.; Fortini, E.; Spanhol-Rosseto, A.; Sportoletti, P.; Mannucci, R.; Martelli, M. P.; Klein-Hitpass, L.; Falini, B.; Tiacci, E. (2015). BRAF inhibitors reverse the unique molecular signature and phenotype of hairy cell leukemia and exert potent antileukemic activity. *Blood*, 125 (8), 1207–1216.
119. Phillips, P. A.; McCarroll, J. A.; Park, S.; Wu, M. J.; Pirola, R.; Korsten, M.; Wilson, J. S.; Apte, M. V. (2003). Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut*, 52 (2), 275–282.
120. Provenzano, P. P.; Cuevas, C.; Chang, A. E.; Goel, V. K.; Von Hoff, D. D.; Hingorani, S. R. (2012). Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21 (3), 418–429.
121. Public Health Agency of Canada (2015). Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics. Canadian Cancer Statistics 2015. Canadian Cancer Society. Toronto.
122. Rahib, L.; Smith, B. D.; Aizenberg, R.; Rosenzweig, A. B.; Fleshman, J. M.; Matrisian, L. M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Research*, 74 (11), 2913–2921.
123. Raimondi, S.; Lowenfels, A. B.; Morselli-Labate, A. M.; Maisonneuve, P.; Pezzilli, R. (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis: aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 24 (3), 349–358.

124. Raju, R. S.; Coburn, N.; Liu, N.; Porter, J. M.; Seung, S. J.; Cheung, M. C.; Goyert, N.; Leighl, N. B.; Hoch, J. S.; Trudeau, M. E.; Evans, W. K.; Dainty, K. N.; Earle, C. C.; Mittmann, N. (2015). A population-based study of the epidemiology of pancreatic cancer: a brief report. *Current Oncology*, 22 (6), e478-484.
125. Remmers, N.; Bailey, J. M.; Am Mohr; Hollingsworth, M. A. (2010). Molecular pathology of early pancreatic cancer. *Cancer Biomarkers*, 9 (1-6), 421–440.
126. Rhim, A. D.; Oberstein, P. E.; Thomas, D. H.; Mirek, E. T.; Palermo, C. F.; Sastra, S. A.; Dekleva, E. N.; Saunders, T.; Becerra, C. P.; Tattersall, I. W.; Westphalen, C. B.; Kitajewski, J.; Fernandez-Barrena, M. G.; Fernandez-Zapico, M. E.; Iacobuzio-Donahue, C.; Olive, K. P.; Stanger, B. Z. (2014). Stromal Elements Act to Restrict, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 25 (6), 735–747.
127. Richardson, P. G.; Eng, C.; Kolesar, J.; Hideshima, T.; Anderson, K. C. (2012). Perifosine, an oral, anti-cancer agent and inhibitor of the Akt pathway. Mechanistic actions, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical activity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 8 (5), 623–633.
128. Rodriguez-Viciana, P.; Warne, P. H.; Dhand, R.; Vanhaesebroeck, B.; Gout, I.; Fry, M. J.; Waterfield, M. D.; Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 370 (6490), 527–532.
129. Rosendahl, J.; Bödeker, H.; Mössner, J.; Teich, N. (2007). Hereditary chronic pancreatitis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2:1, 1–10.
130. Schmieder, R.; Hoffmann, J.; Becker, M.; Bhargava, A.; Müller, T.; Kahmann, N.; Ellinghaus, P.; Adams, R.; Rosenthal, A.; Thierauch, K. H.; Scholz, A.; Wilhelm, S. M.; Zopf, D. (2014). Regorafenib (BAY 73-4506): antitumor and antimetastatic activities in preclinical models of colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 135 (6), 1487–1496.
131. Schneider, E.; Schmid-Kotsas, A.; Zhao, J.; Weidenbach, H.; Schmid, R. M.; Menke, A.; Adler, G.; Waltenberger, J.; Grünert, A.; Bachem, M. G. (2001). Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 281, C532-C543.
132. Schneiderhan, W.; Diaz, F.; Fundel, M.; Zhou, S.; Siech, M.; Hasel, C.; Moller, P.; Gschwend, J. E.; Seufferlein, T.; Gress, T.; Adler, G.; Bachem, M. G. (2007). Pancreatic stellate cells are an important source of MMP-2 in human pancreatic cancer and accelerate tumor progression in a murine xenograft model and CAM assay. *Journal of Cell Science*, 120 (3), 512–519.
133. Sharp, L.; Carsin, A.-E.; Cronin-Fenton, D. P.; O'Driscoll, D.; Comber, H. (2009). Is there under-treatment of pancreatic cancer? Evidence from a population-based study in Ireland. *European Journal of Cancer*, 45 (8), 1450–1459.
134. Shea, M.; Costa, D. B.; Rangachari, D. (2016). Management of advanced non-small cell lung cancers with known mutations or rearrangements: latest evidence and treatment approaches. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 10 (2), 113–129.

135. Shek, F. W.-T.; Benyon, R. C.; Walker, F. M.; McCrudden, P. R.; Pender, S. L. F.; Williams, E. J.; Johnson, P. A.; Johnson, C. D.; Bateman, A. C.; Fine, D. R.; Iredale, J. P. (2002). Expression of Transforming Growth Factor- β 1 by Pancreatic Stellate Cells and Its Implications for Matrix Secretion and Turnover in Chronic Pancreatitis. *The American Journal of Pathology*, 160 (5), 1787–1798.
136. Shen, J.; Xu, L.; Zhao, Q. (2016). Perifosine and ABT-737 synergistically inhibit lung cancer cells in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473 (4), 1170–1176.
137. Sherman, M. H.; Yu, R. T.; Engle, D. D.; Ding, N.; Atkins, A. R.; Tiriack, H.; Collisson, E. A.; Connor, F.; Dyke, T. van; Kozlov, S.; Martin, P.; Tseng, T. W.; Dawson, D. W.; Donahue, T. R.; Masamune, A.; Shimosegawa, T.; Apte, M. V.; Wilson, J. S.; Ng, B.; Lau, S. L.; Gunton, J. E.; Wahl, G. M.; Hunter, T.; Drebin, J. A.; O'Dwyer, P. J.; Liddle, C.; Tuveson, D. A.; Downes, M.; Evans, R. M. (2014). Vitamin D Receptor-Mediated Stromal Reprogramming Suppresses Pancreatitis and Enhances Pancreatic Cancer Therapy. *Cell*, 159 (1), 80–93.
138. Shimizu, K.; Hashimoto, K.; Tahara, J.; Imaeda, H.; Andoh, A.; Shiratori, K. (2012). Pancreatic stellate cells do not exhibit features of antigen-presenting cells. *Pancreas*, 41 (3), 422–427.
139. Shimizu, K.; Kobayashi, M.; Tahara, J.; Shiratori, K. (2005). Cytokines and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Ligand Regulate Phagocytosis by Pancreatic Stellate Cells. *Gastroenterology*, 128 (7), 2105–2118.
140. Sikkens, E. C. M.; Cahen, D. L.; Koch, A. D.; Braat, H.; Poley, J.-W.; Kuipers, E. J.; Bruno, M. J. (2013). The prevalence of fat-soluble vitamin deficiencies and a decreased bone mass in patients with chronic pancreatitis. *Pancreatology*, 13 (3), 238–242.
141. Smalley, K. S. (2010). PLX-4032, a small-molecule B-Raf inhibitor for the potential treatment of malignant melanoma. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 11 (6), 699–706.
142. Sparmann, G.; Hohenadl, C.; Tornøe, J.; Jaster, R.; Fitzner, B.; Koczan, D.; Thiesen, H.-J.; Glass, A.; Winder, D.; Liebe, S.; Emmrich, J. (2004). Generation and characterization of immortalized rat pancreatic stellate cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287 (1), G211-219.
143. Stevens, R. J.; Roddam, A. W.; Beral, V. (2007). Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes. Systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 96 (3), 507–509.
144. Takigawa, H.; Kitadai, Y.; Shinagawa, K.; Yuge, R.; Higashi, Y.; Tanaka, S.; Yasui, W.; Chayama, K. (2016). Multikinase inhibitor regorafenib inhibits the growth and metastasis of colon cancer with abundant stroma. *Cancer Science*, 107 (5), 601–608.
145. Tramacere, I.; Scotti, L.; Jenab, M.; Bagnardi, V.; Bellocco, R.; Rota, M.; Corrao, G.; Bravi, F.; Boffetta, P.; La Vecchia, C. (2010). Alcohol drinking and pancreatic cancer risk. A meta-analysis of the dose-risk relation. *International Journal of Cancer*, 126 (6), 1474–1486.

146. Treacy, P. J.; Worthley, C. S. (1996). Pancreatic stents in the management of chronic pancreatitis. *The Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 66 (4), 210–213.
147. Ueno, H.; Kosuge, T.; Matsuyama, Y.; Yamamoto, J.; Nakao, A.; Egawa, S.; Doi, R.; Monden, M.; Hatori, T.; Tanaka, M.; Shimada, M.; Kanemitsu, K. (2009). A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer. Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *British Journal of Cancer*, 101 (6), 908–915.
148. Unanue, E. R. (2007). Ito Cells, Stellate Cells, and Myofibroblasts. New Actors in Antigen Presentation. *Immunity*, 26 (1), 9–10.
149. U.S. Food and Drug Administration (2013). MEKINIST (trametinib) tablets, for oral use Initial U.S. Approval. Silver Spring. Online verfügbar unter http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/204114s004lbl.pdf, zuletzt geprüft am 13.11.2016.
150. U.S. National Institutes of Health (2007). Clinical and Molecular-Metabolic Phase II Trial of Perifosine for Recurrent/Progressive Malignant Gliomas. Bethesda (Identifikation NCT00590954). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00590954?term=NCT00590954&rank=1>, zuletzt geprüft am 13.11.2016.
151. U.S. National Institutes of Health (2008). A Phase I/II, Multi-center, Open-label Study of BEZ235, Administered Orally on a Continuous Daily Dosing Schedule in Adult Patients With Advanced Solid Malignancies Including Patients With Advanced Breast Cancer. Bethesda (Identifikation NCT00620594). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00620594?term=BEZ235&rank=4>, zuletzt geprüft am 13.11.2016.
152. U.S. National Institutes of Health (2012a). A Multicenter, Two Stage, Phase II Study, Evaluating the Efficacy of Oral BEZ235 Plus Best Supportive Care (BSC) Versus Placebo Plus BSC in the Treatment of Patients With Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors (pNET) After Failure of mTOR Inhibitor Therapy. Bethesda (Identifikation NCT01658436). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01658436?term=NCT01658436&rank=1>, zuletzt geprüft am 13.11.2016.
153. U.S. National Institutes of Health (2012b) A Phase I, Dose-finding Study of the Oral, Dual Phosphatidylinositol 3(PI3)-Kinase / Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitor BEZ235 in Adult Patients With Relapsed or Refractory Acute Leukemia. Bethesda (Identifikation NCT01756118). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01756118?term=NCT01756118&rank=1>, zuletzt geprüft am 13.11.2016.
154. U.S. National Institutes of Health (2013). Randomized, Open-label, Neoadjuvant Phase 2 Study Comparing the Effects of AR Inhibition With and Without SRC or MEK Inhibition on the Development of EMT in Prostate Cancer. Bethesda (Identifikation NCT01990196). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01990196?term=NCT01990196&rank=1>, zuletzt geprüft am 13.11.2016.

155. Viallard, J. F.; Lacombe, F.; Belloc, F.; Pellegrin, J. L.; Reiffers, J. (2001). Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer radiotherapie*, 5 (2), 109–129.
156. Vonlaufen, A.; Phillips, P. A.; Xu, Z.; Zhang, X.; Yang, L.; Pirola, R. C.; Wilson, J. S.; Apte, M. V. (2011). Withdrawal of alcohol promotes regression while continued alcohol intake promotes persistence of LPS-induced pancreatic injury in alcohol-fed rats. *Gut*, 60 (2), 238–246.
157. Wang, L.; Gout, I.; Proud, C. G. (2001). Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (35), 32670–32677.
158. Wang, L. M.; Silva, M. A.; D'Costa, Z.; Bockelmann, R.; Soonawalla, Z.; Liu, S.; O'Neill, E.; Mukherjee, S.; McKenna, W. G.; Muschel, R.; Fokas, E. (2016). The prognostic role of desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*, 7 (4), 4183–4194.
159. Warndorf, M. G.; Kurtzman, J. T.; Bartel, M. J.; Cox, M.; Mackenzie, T.; Robinson, S.; Burchard, P. R.; Gordon, S. R.; Gardner, T. B. (2011). Early fluid resuscitation reduces morbidity among patients with acute pancreatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 9 (8), 705–709.
160. Watari, N.; Hotta, Y.; Mabuchi, Y. (1982). Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 58 (4-6), 837–858.
161. Wei, N.; Chu, E.; Wu, S.-y.; Wipf, P.; Schmitz, J. C. (2015). The cytotoxic effects of regorafenib in combination with protein kinase D inhibition in human colorectal cancer cells. *Oncotarget*, 6 (7), 4745–4756.
162. Weinberg, B. A.; Yabar, C. S.; Brody, J. R.; Pishvaian, M. J. (2015). Current Standards and Novel Treatment Options for Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Oncology*, 29 (11), 809-820, 886.
163. Whatcott, C. J.; Posner, R. G.; Hoff, D. D. von; Han, H. (2012). Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment. Transworld Research Network. Trivandrum.
164. Wilhelm, S. M.; Carter, C.; Tang, L.; Wilkie, D.; McNabola, A.; Rong, H.; Chen, C.; Zhang, X.; Vincent, P.; McHugh, M.; Cao, Y.; Shujath, J.; Gawlak, S.; Eveleigh, D.; Rowley, B.; Liu, L.; Adnane, L.; Lynch, M.; Auclair, D.; Taylor, I.; Gedrich, R.; Voznesensky, A.; Riedl, B.; Post, L. E.; Bollag, G.; Trail, P. A. (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Research*, 64 (19), 7099–7109.
165. Wilhelm, S. M.; Dumas, J.; Adnane, L.; Lynch, M.; Carter, C. A.; Schütz, G.; Thierauch, K.-H.; Zopf, D. (2011). Regorafenib (BAY 73-4506). A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *International Journal of Cancer*, 129 (1), 245–255.
166. Wilson, J. S.; Pirola, R. C.; Apte, M. V. (2014). Stars and stripes in pancreatic cancer: role of stellate cells and stroma in cancer progression. *Frontiers in Physiology*, 5, 52.

167. Winau, F.; Hegasy, G.; Weiskirchen, R.; Weber, S.; Cassan, C.; Sieling, P. A.; Modlin, R. L.; Liblau, R. S.; Gressner, A. M.; Kaufmann, S. H. E. (2007). Ito Cells Are Liver-Resident Antigen-Presenting Cells for Activating T Cell Responses. *Immunity*, 26 (1), 117–129.
168. Witt, H.; Apte, M. V.; Keim, V.; Wilson, J. S. (2007). Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology*, 132 (4), 1557–1573.
169. Witteck, L.; Jaster, R. (2015). Trametinib and dactolisib but not regorafenib exert antiproliferative effects on rat pancreatic stellate cells. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 14 (6), 642–650.
170. Xiao, W.; Jiang, W.; Shen, J.; Yin, G.; Fan, Y.; Wu, D.; Qiu, L.; Yu, G.; Xing, M.; Hu, G.; Wang, X.; Wan, R.; Real, F. X. (2015). Retinoic Acid Ameliorates Pancreatic Fibrosis and Inhibits the Activation of Pancreatic Stellate Cells in Mice with Experimental Chronic Pancreatitis via Suppressing the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *PLOS ONE*, 10 (11), e0141462.
171. Yadav, D.; Lowenfels, A. B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 144 (6), 1252–1261.
172. Zha, M.; Xu, W.; Zhai, Q.; Li, F.; Chen, B.; Sun, Z. (2014). High Glucose Aggravates the Detrimental Effects of Pancreatic Stellate Cells on Beta-Cell Function. *International Journal of Endocrinology*, 2014 (6), 1–8.
173. Zhu, Z.; Liu, W.; Gotlieb, V. (2016). The rapidly evolving therapies for advanced melanoma—Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 99, 91–99.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABCG 2	<i>ATP binding cassette G2 transporter</i>
AKT	Proteinkinase B
α -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ASR	altersstandardisierte Rate
Bad	<i>Bcl-2-antagonist of cell death</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
Caspase	<i>cysteinyI-aspartate specific protease</i>
CCND1	Gen, welches für das Protein Cyclin D1 kodiert
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDKN1A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
Col1a1	Kollagen Typ I, alpha 1
CP	chronische Pankreatitis
CT	Computertomografie
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CTRC	Chymotrypsin C
CYP 3A4	Cytochrom P 450 3A4
DEPC	Diethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
et al.	<i>et alii</i>
EZM	Extrazellularmatrix
FGFR-1	<i>fibroblast growth factor receptor 1</i>

FKS	fetales Kälberserum
Foxp3	<i>forkhead-box-protein P3</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen-D related</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K-Ras	Kirsten-Ras
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK	mitogen aktivierte Proteinkinasekinase
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mechanistic target of Rapamycin</i>
NEA	nicht essentielle Aminosäure
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
P	Phospho
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PK	Pankreaskarzinom
PRSS1	Gen, welches für ein Trypsinogen codiert
PSZ	pankreatische Sternzelle
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>

RET	<i>rearranged during transfection</i> , ein Protoonkogen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SMI	<i>small molecule kinase inhibitor</i>
SPINK1	<i>serine protease inhibitor Kazal-type 1</i>
<i>STK11</i>	<i>serine/threonine kinase 11</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TIE	<i>tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	<i>unit</i>
UGT1A9	Gen; welches für die UDP-Glucuronosyltransferase 1-9 codiert
UV	ultraviolett
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor</i>

9 Herstellerverzeichnis

Hersteller	Firmensitz
Ambion by Life technologies	Foster City, Kalifornien, USA
Anthos labtec	Wals bei Salzburg, Österreich
Applichem	Darmstadt, Deutschland
Applied Biosystems	Foster City, Kalifornien, USA
Biochrom	Berlin, Deutschland
BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
Bio-Rad Laboratories	Hercules, Kalifornien, USA
Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts, USA
Dynatech	Rückersdorf, Deutschland
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel, Deutschland
Gibco	Waltham, Massachusetts, USA
Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Hettich Lab Technology	Tuttlingen, Deutschland
IKA-Labortechnik	Staufen, Deutschland
Implen	Westlake Village, Kalifornien, USA
Intas	Ahmedabad, Gujarat, Indien
Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
Integra Biosciences GmbH	Biebertal, Deutschland
J.T.Baker	Center Valley, Pennsylvania, USA
Kavalierglass, Co.Ltd	Sázava, Tschechische Republik
Kojair Tech Oy	Mänttä-Vilppula, Finnland
Labortechnik Fröbel GmbH	Lindau, Deutschland
Li-Cor Biosciences GmbH	Bad Homburg, Deutschland
Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien, USA
Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Mettler-Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main, Deutschland
PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda Königshofen, Deutschland

PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Promega GmbH	Mannheim, Deutschland
Riedel-de-Haën	Seelze, Deutschland
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
Rockland Immunochemicals Inc.	Limerick, Pennsylvania, USA
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Scotsmann Ice Systems	Vernon Hills, Illinois, USA
Selleckchem	München, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Bibby Scientific Limited	Staffordshire, England, UK
Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
WITEG Labortechnik GmbH	Wertheim, Deutschland

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich während der Erstellung meiner Promotionsarbeit unterstützt und beraten haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jaster für die Vergabe und Betreuung dieser interessanten Arbeit. Die konstruktiven Ratschläge während meiner Zeit im Labor sowie bei der Erstellung und Korrektur dieser Dissertation waren mir eine große Hilfe.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der gastroenterologischen Forschungslabore für das angenehme Arbeitsklima und die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft. Hervorzuheben ist dabei insbesondere die Unterstützung durch Frau Katja Bergmann, die mich mit den methodischen Arbeitsweisen im Labor vertraut machte und mir durch viele nützliche Hinweise die Arbeit erleichterte.

Von ganzem Herzen danke ich auch meiner Familie, die immer an mich glaubt und mir liebevoll zur Seite steht.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinem Freund Tim, der mich immer tatkräftig unterstützt hat, damit ich im Labor sein konnte und mich aufgebaut hat, wenn es mal nicht so gut lief.